

Analyse von phenolischen Naturstoffen

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
dem
Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Yana Ghassan Abdullah
aus Damaskus (Syrien)

Marburg/Lahn 2010

vom Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

als Dissertation angenommen am:

10.08.2010

Erstgutachterin:

Prof. Dr. M. Petersen

Zweitgutachterin:

PD Dr. habil. S. Anagnostou

Tag der mündlichen Prüfung

11.08.2010

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1.	Rosmarinsäure	7
1.1.1.	Auftreten der Rosmarinsäure m Pflanzenreich	7
1.1.2.	Pharmazeutische Wirkungen	9
1.1.3.	Biosynthese der Rosmarinsäure	10
1.2.	Chlorogensäure	12
1.2.1.	Allgemeine Beschreibung	12
1.2.2.	Pharmazeutische Wirkungen	12
1.2.3.	Biosynthese der Chlorogensäure	12
1.3.	Rutin	13
1.3.1.	Allgemeine Beschreibung	13
1.3.2.	Pharmazeutische Wirkungen	13
1.3.3.	Biosynthese von Rutin	14
1.4.	Curcuminoide	15
1.4.1.	Allgemeine Beschreibung	15
1.4.2.	Pharmazeutische Wirkungen	16
1.5.	Gingerole	17
1.5.1.	Allgemeine Beschreibung	17
1.5.2.	Pharmazeutische Wirkungen	17
1.5.3.	Biosynthese der Curcuminoide und Gingerole	18
1.5.4.	Zellkulturen	20
1.6.	Klassifikation des Pflanzenreichs	20
1.6.1.	Farne	20
1.6.1.1.	Ordnung Polypodiales	20
1.6.2.	Klassifikation der Angiospermen	21
1.6.2.1.	Monokotyledonen	23
1.6.2.1.1.	Ordnung Alismatales (Froschlöffelartige)	23
1.6.2.1.2.	Ordnung Liliales (Lilienartige)	23
1.6.2.1.3.	Ordnung Poales (Süßgrasartige)	23
1.6.2.1.4.	Ordnung Zingiberales (Ingwerartige)	23
1.6.2.2.	Eudikotyledonen	26
1.6.2.2.1.	Rosiden	26

1.6.2.2.2.	Eurosiden I (Fabiden)	26
1.6.2.2.2.1.	Ordnung Celastrales (Spindelbaumartige)	26
1.6.2.2.2.2.	Ordnung Cucurbitales (Kürbisartige)	27
1.6.2.2.3.	Eurosiden II (Malviden)	27
1.6.2.2.3.1.	Ordnung Geraniales (Storachschnabelartige)	27
1.6.2.2.3.2.	Ordnung Myrtales (Myrtenartige)	27
1.6.2.2.3.3.	Ordnung Malvales (Malvenartige)	28
1.6.2.2.4.	Asteriden	29
1.6.2.2.4.1.	Ordnung Cornales (Hartriegelartige)	29
1.6.2.2.5.	Euasteriden I (Lamiiden)	29
1.6.2.2.5.1.	Ordnung Gentianales (Enzianartige)	30
1.6.2.2.5.2.	Ordnung Lamiales (Lippenblütenartige)	30
1.6.2.2.5.3.	Ordnung Solanales (Nachtschattenartige)	32
1.6.2.2.6.	Euasteriden II (Campanuliden)	33
1.6.2.2.6.1.	Ordnung Apiales (Doldenblütlerartige)	33
1.6.2.2.6.2.	Ordnung Aquifoliales (Stechpalmenartige)	33
1.6.2.2.6.3.	Ordnung Asterales (Asterartige)	33
1.6.2.2.6.4.	Ordnung Dipsacales (Kardenartige)	34
1.7.	Ziele der Arbeit	34
2.	Material und Methoden	35
2.1.	Chemikalien und Geräte	35
2.1.1.	Versuchsorganismen	35
2.1.2.	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	35
2.1.3.	Komponenten für Nährmedien	37
2.1.4.	Geräte	38
2.2.	Nährmedien für Pflanzenzellkulturen	39
2.2.1.	Stammlösungen für CB-Medien	39
2.2.2.	CB-Medien	41
2.2.3.	B5-Medium	42
2.2.4.	Stammlösungen für MS-Medien	42
2.2.5.	MS-Medium	44
2.2.6.	MS-Li-Medium	44
2.2.7.	Weitere Abwandlungen des MS-Mediums	44

2.2.8.	Medium nach Schenk & Hildebrandt	45
2.2.9.	Medium nach Schenk & Hildebrandt (SHB)	47
2.3.	Medien zur Kultivierung von Bakterien	48
2.3.1.	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	48
2.3.2.	YMB Medium (yeast mannitol broth)	48
2.4.	Pflanzliche <i>in vitro</i> -Kulturen	48
2.4.1.	Anlegen von Kalluskulturen	48
2.4.2.	Anlegen von Kalluskulturen aus Rhizomknospen	49
2.4.3.	Anlegen von Suspensionskulturen	49
2.4.4.	Elicitierung von Suspensionskulturen	49
2.4.5.	Anlage von Hairy Root-Kulturen	50
2.4.5.1.	Anzucht der <i>Agrobacterium rhizogenes</i> -Stämme LBA9402, LBA15834 und TR105	50
2.4.5.2.	Etablierung der Hairy Root-Kulturen	50
2.5.	Extraktion und Nachweis von Gingerolen und Curcuminoiden	51
2.5.1.	Extraktion von Rhizomen und <i>in vitro</i> -Kulturen	51
2.5.1.1.	Extraktion von frischem Pflanzenmaterial	51
2.5.1.2.	Extraktion von getrocknetem Pflanzenmaterial	52
2.5.1.3.	Extraktion von getrockneten Kalluszone	52
2.5.2.	Analyse der Zingiberaceen-Naturstoffe über HPLC und Dünnschicht chromatografie	52
2.5.2.1.	Referenzlösungen	52
2.5.2.2.	Optimierung der Analyse von Curcuminoiden und Gingerolen über HPLC	53
2.5.2.3.	Optimierung der Analyse von Curcuminoiden und Gingerolen über DC	54
2.6.	Extraktion und Nachweis von Rosmarinsäure, Chlorogensäure und Rutin	55
2.6.1.	Pflanzenmaterial	55
2.6.2.	Extraktion	55
2.6.3.	HPLC-Analyse von RA, CA und Rutin	55
2.6.4.	Dünnschichtchromatografische Untersuchung auf RA, CA und Rutin	56

2.6.4.1.	DC zur Identifizierung von RA und CA	56
2.6.4.2.	DC zur Identifizierung von Rutin	57
2.6.5.	¹ H-NMR	57
3.	Ergebnisse und Diskussion	58
3.1.	Farne	58
3.2.	Monokotyledonen	60
3.2.1.	Ordnung Alismatales	60
3.2.1.1.	Familie Araceae	60
3.2.1.2.	Familie Juncaginaceae	60
3.2.2.	Liliales und Poales	60
3.2.3.	Zingiberales	61
3.3.	Eudikotyledonen	71
3.3.1.	Asteriden	71
3.3.1.1.	Familie Cornaceae	71
3.3.2.	Euasteriden I	72
3.3.2.1.	Familie Boraginaceae	72
3.3.2.2.	Ordnung Gentiales	77
3.3.2.2.1.	Familie Asclepiadaceae	77
3.3.2.2.2.	Familie Apocynaceae	78
3.3.2.2.3.	Familie Gentianaceae	78
3.3.2.2.4.	Familie Rubiaceae	78
3.3.2.3.	Ordnung Lamiales	79
3.3.2.3.1.	Familie Acanthaceae	79
3.3.2.3.2.	Familie Gesneriaceae	79
3.3.2.3.3.	Familie Lamiaceae	80
3.3.2.3.4.	Familie Oleaceae	86
3.3.2.3.5.	Familie Plantaginaceae	87
3.3.2.3.6.	Familie Scrophulariaceae	88
3.3.2.3.7.	Familie Verbenaceae	88
3.3.2.4.	Ordnung Solanales	89

3.3.2.4.1.	Familie Convolvulaceae	89
3.3.2.4.2.	Familie Solanaceae	90
3.3.3.	Euasteriden II	90
3.3.3.1.	Ordnung Apiales	90
3.3.3.1.1.	Familie Apiaceae	90
3.3.3.1.2.	Familie Araliaceae	93
3.3.3.2.	Ordnung Aquifoliales	93
3.3.3.2.1.	Familie Aquifoliaceae	93
3.3.3.3.	Ordnung Asterales	93
3.3.3.3.1.	Familie Asteraceae	93
3.3.3.3.2.	Familie Menyanthaceae	94
3.3.3.4.	Ordnung Dipsacales	94
3.3.3.4.1.	Familie Caprifoliaceae	94
3.3.3.4.2.	Familie Dipsacaceae	95
3.3.4.	Rosiden	96
3.3.4.1.	Ordnung Geraniales	96
3.3.4.1.1.	Familie Geraniaceae	96
3.3.4.2.	Ordnung Myrtales	97
3.3.4.2.1.	Familie Lythraceae	97
3.3.4.2.2.	Familie Onagraceae	98
3.3.5.	Eurosiden I	98
3.3.5.1.	Ordnung Celastrales	98
3.3.5.1.1.	Familie Celastraceae	98
3.3.5.2.	Ordnung Cucurbitales	99
3.3.5.2.1.	Familie Cucurbitaceae	99
3.3.5.3.	Ordnung Rosales	99
3.3.5.3.1.	Familie Hydrangeaceae	99
3.3.6.	Eurosiden II	99
3.3.6.1.	Ordnung Malvales	100
3.3.6.1.1.	Familie Malvaceae	100
3.3.6.1.2.	Familie Thymelaeaceae	102
3.4.	Rosmarinsäure, Chlorogensäure als chemotaxonomische Marker im Pflanzenreich	102
3.5.	Das Vorkommen von Naturstoffen in <i>in-vitro</i> -Kulturen von	105

	Arten der Zingiberaceae	
3.5.1.	Ergebnisse	105
3.5.1.1.	<i>Curcuma xanthorrhiza</i> und <i>Curcuma longa</i> (Kurkuma, Gelbwurzel)	105
3.5.1.2.	<i>Zingiber officinale</i>	106
3.5.2.	Diskussion	107
4.	Zusammenfassung	109
4.1.	Vorkommen von Rosmarinsäure und Chlorogensäure im Pflanzenreich:	109
4.2.	Das Vorkommen von Naturstoffen in <i>In-vitro</i> -Kulturen von Arten der Zingiberaceae:	110
5.	Summary	111
5.1.	Occurrence of rosmarinic acid and chlorogenic acid in the plant kingdom:	111
5.2.	The occurrence of natural compounds in <i>in vitro</i> cultures of species of the Zingiberaceae:	112
6.	Literaturverzeichnis	113
7.	Anhang	132
	Abkürzungsverzeichnis	132
	Dünnschichtchromatografische Analysen	133
	Danksagung	146
	Lebenslauf	147

1. Einleitung

1.1. Rosmarinsäure

1.1.1. Auftreten der Rosmarinsäure im Pflanzenreich

Rosmarinsäure ist ein Ester aus Kaffeesäure und 3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure (Abb. 1). Im Jahr 1958 wurde dieser sekundäre Pflanzeninhaltsstoff zum ersten Mal aus *Rosmarinus officinalis* isoliert (Scarpati und Oriente, 1958).

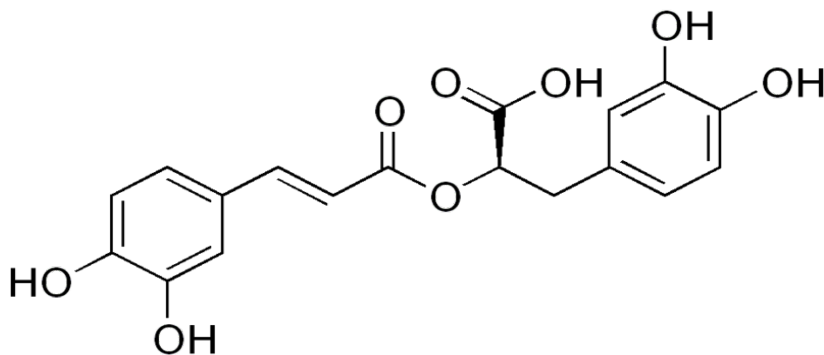


Abb. 1: Struktur der Rosmarinsäure (http://www.awl.ch/heilpflanzen/rosmarinus_officinalis/index.htm).

Rosmarinsäure ist im Pflanzenreich weit verbreitet. In der Familie der Boraginaceae ist sie durchgängig zu finden, wohingegen sie bei den Lamiaceae weitgehend auf die Unterfamilie der Nepetoideae beschränkt ist (Litvinenko et al., 1975). Weiterhin kommt Rosmarinsäure in verschiedenen anderen Pflanzentaxa vor, wie z.B. bei Hornmoosen (Anthocerotaceae; Takeda et al., 1990), Farnen (Blechnaceae; Harborne, 1965) oder bei Seegräsern (Zosteraceae; Petersen und Simmonds, 2003). In Tabelle 1 sind die bis jetzt bekannten Ergebnisse des Vorkommens von Rosmarinsäure im Pflanzenreich erfasst.

Tabelle 1: Vorkommen von Rosmarinsäure im Pflanzenreich (nach Petersen et al., 2009)

Anthoceroephytina			
	Anthocerotales	Anthocerotaceae	Takeda et al. (1990) und Petersen (2003)
Filicophytina			
	Polypodiales	Blechnaceae	Harborne (1966); Bohm (1968); Häusler et al. (1992)
Spermatophytina, Klasse Magnoliopsida			
Basale Ordnungen	Chloranthales	Chloranthaceae	Zhu et al. (2008)
Monokotyledonen	Alismatales	Araceae	Aquino et al. (2001)
		Potamogetonaceae	Petersen (unveröffentlicht)
		Zosteraceae	Ravn et al. (1994)
	Poales	Poaceae	Sterbova et al. (2004)
	Zingiberales	Cannaceae	Petersen und Sim- monds (2003); Yun et al. (2004)
		Marantaceae	Abdullah et al. (2008)
	Liliales	Melanthaceae	Lee et al. (2008)
Eudikotyledonen	Myrtales	Onagraceae	Huang et al. (2007)
	Celastrales	Celastraceae	Ly et al. (2006)
	Rosales	Rosaceae	Amzad Hossain et al. (2009)
	Cucurbitales	Cucurbitaceae	De Tommasi et al. (1991)
	Malvales	Malvaceae/Sterculiaceae	Satake et al. (1999)
		Malvaceae/Tiliaceae	Lasure et al. (1994); Ho et al. (1995)
	Gentianales	Rubiaceae	Aquino et al. (1990)

	Lamiales	Lamiaceae	Scarpati and Oriente, (1958); Litvinenko et al. (1975)
		Plantaginaceae	Kurkin et al. (1988) zitiert in Holzmanna (1995)
		Acanthaceae	Harborne (1966)
		Scrophulariaceae	Fernandez et al. (1995)
	Ungeklärt	Boraginaceae/Hydrophyllaceae	Kelley et al. (1975); Harborne (1966); Petersen (unveröffentlicht)
	Apiales	Apiaceae	Hiller (1965); Parejo et al. (2004)
		Araliaceae	Trute und Nahrstedt (1996)
	Asterales	Asteraceae	Rubio et al. (1992)
	Dipsacales	Dipsacaceae	Kowalczyk (1996)

1.1.2. Pharmazeutische Wirkungen

Rosmarinsäure hat vielfältige biologische Effekte, da sie als Schutz vor Pathogenen und Fraßfeinden dient. Rosmarinsäure wirkt als Antioxidans (Van Kessel et al., 1985), adstringierend, entzündungshemmend, antiviral und antibakteriell (Parnham und Kesselring, 1985), hemmt die Prostaglandinsynthese (Rampart et al., 1986).

Mehrere Präparate mit Pflanzenextrakten enthalten Rosmarinsäure. Beispiele sind

- Lomaherpan® - enthält Melissenextrakt und ist in Apotheken als Creme gegen Lippenherpes erhältlich.
- Traumaplant® - ist eine Salbe, die gegen Sportverletzungen verwendet wird.
- Allerpril® - enthält Öl aus *Perilla frutescens* mit Rosmarinsäure und wird als Nahrungsergänzungsmittel gegen Allergien benutzt.
- Salvysat® - enthält pflanzliche Inhaltsstoffe aus Salbei (Rosmarinsäure als Gerbstoff, ätherischen Öle). Das Mittel hat innerlich eine Hemmung der Schweiß- und Milchdrüsensekretion und äußerlich im Mund-Rachenraum hat antibakterielle Effekte und wirkt entzündungshemmend.

Außerdem wird Rosmarinsäure auch für Kosmetika benutzt (<http://de.wikipedia.org>; <http://www.netdokter.at>).

1.1.3. Biosynthese der Rosmarinsäure

Die Biosynthese der Rosmarinsäure konnte mit Zellkulturen von *Coleus blumei* und *Anchusa officinalis* aufgeklärt werden (De-Eknamkul und Ellis, 1987; Petersen et al., 1993). An der Biosynthese sind acht Enzyme des Sekundärstoffwechsels beteiligt, diese Enzyme wurden bereits charakterisiert (Petersen et al., 1993; Petersen, 1997). Die beiden Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin dienen als Ausgangssubstanzen für die Biosynthese der Rosmarinsäure (Ellis und Towers, 1970). L-Phenylalanin wird durch die Phenylalanin Ammoniak-Lyase (PAL) zu trans-Zimtsäure desaminiert. Die PAL konnte von Razzaque und Ellis (1977) in *Anchusa officinalis* nachgewiesen werden und wurde in Proteinextrakten aus Zellkulturen von *Coleus blumei* charakterisiert (Petersen, 1994). Die Hydroxylierung der Zimtsäure wird durch die Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H), einer Cytochrom P450-Monooxygenase, katalysiert, die ebenfalls aus *Coleus blumei*-Zellkulturen charakterisiert wurde (Petersen, 1997). Dann erfolgt die Aktivierung durch die Hydroxyzimtsäure:Coenzym A-Ligase (4CL) zu 4-Cumaroyl-CoA (Karwatzki et al., 1989).

Als zweite Aminosäure wird L-Tyrosin durch die Tyrosin Aminotransferase (TAT) zu 4-Hydroxyphenylpyruvat transaminiert (De Eknamkul und Ellis, 1987; Mizukami und Ellis, 1991; Kempin, 1994). Anschließend wird 4-Hydroxyphenylpyruvat von der Hydroxyphenylpyruvat Reduktase (HPPR) zum entsprechenden R(+)-4-Hydroxyphenyllactat reduziert (Petersen und Alfermann, 1988; Häusler et al., 1991; Kim et al., 2004).

4-Cumaroyl-CoA und 4-Hydroxyphenyllactat werden dann zu 4-Cumaroyl-4'-hydroxyphenyllactat verestert (Petersen und Alfermann, 1988; Petersen, 1991; Petersen et al., 1993). Diese Reaktion wird durch die Rosmarinsäure Synthase (RAS; Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase) katalysiert. Eine Vollängen-cDNA dieses Enzyms wurde aus *Coleus blumei* isoliert und in *E. coli* exprimiert (Berger et al., 2006).

Abschließend wird der Ester durch zwei Cytochrom P450-abhängige Enzymaktivitäten zur Rosmarinsäure hydroxyliert (Hydroxycinnamoyl-

Hydroxyphenyllactat 3- bzw. 3'-Hydroxylase; Petersen, 1997; Eberle et al., 2008). Eine 3'-Hydroxylase wurde neulich auch aus *Lithospermum erythrorhizon*-Suspensionskulturen von einer japanischen Arbeitsgruppe isoliert (Tsuruga et al., 2006).

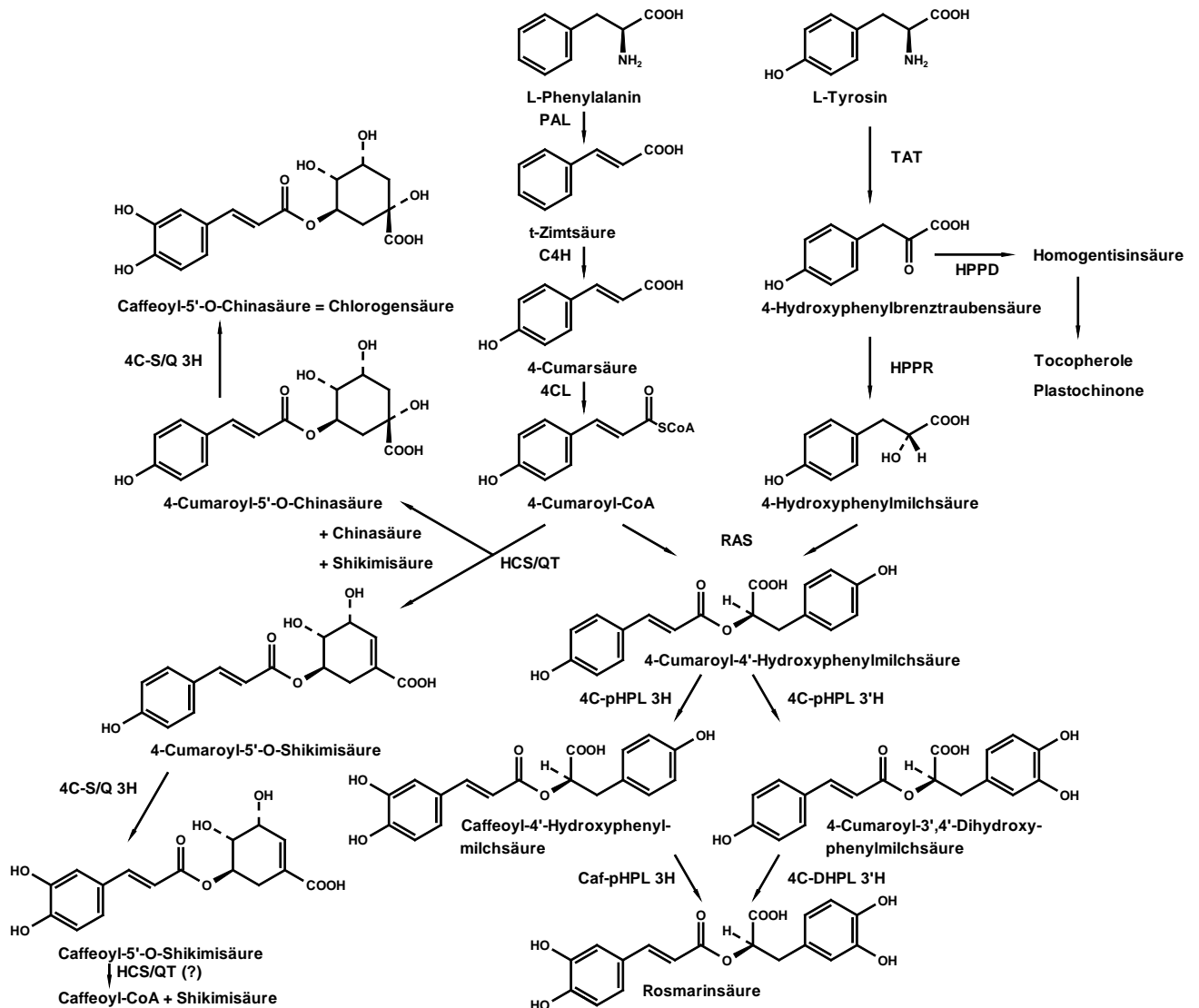


Abb. 2: Biosynthese der Rosmarinsäure, Chlorogensäure und Caffeoylshikimisäure (nach Petersen et al., 2009).

Die Enzyme sind: PAL = Phenylalanin Ammoniak-Lyase; C4H = Zimtsäure 4-Hydroxylase; 4CL = Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase (4-Cumarat:CoA-Ligase); TAT = Tyrosin Aminotransferase; HPPR = Hydroxyphenylpyruvat Reduktase; RAS = "Rosmarinsäure Synthase", Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyphenyllactat Hydroxycinnamoyltransferase; 4C-pHPL 3H, 4C-pHPL 3'H = 4-Cumaroyl-4'-Hydroxyphenyllactat 3/3'-Hydroxylasen; Caf-pHPL 3H = Caffeoyl-4'-Hydroxyphenyllactat 3'-Hydroxylase; 4C-DHPL 3H = 4-Cumaroyl-3',4'-Dihydroxyphenyllactat 3-Hydroxylase; HPPD = Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase; HCS/QT = Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/Chinat Hydroxycinnamoyltransferase; 4C-S/Q 3H = 4-Cumaroylshikimat/chinat 3-Hydroxylase.

1.2. Chlorogensäure

1.2.1. Allgemeine Beschreibung

Die Chlorogensäure ist ein Ester aus Kaffeesäure und Chinasäure (5-Caffeoylchinasäure) (Abb. 3). Dieser Naturstoff ist der am meisten verbreitete Kaffeesäure-Ester im Pflanzenreich (Kaffee-Arten, *Solanum*-Arten; Clifford, 1999). In Monokotyledonen ist diese Verbindung seltener zu finden. Verbreitet sind auch Chlorogensäurederivate, je nachdem an welcher Position (3, 4 oder 5) die Chinasäure mit der Kaffeesäure verestert ist, so z. B. DicaFFEoylchinasäure (Cynarin), Neochlorogensäure (3-Caffeoylchinasäure), Kryptochlorogensäure (4-Caffeoylchinasäure), Feruloylchinasäure.

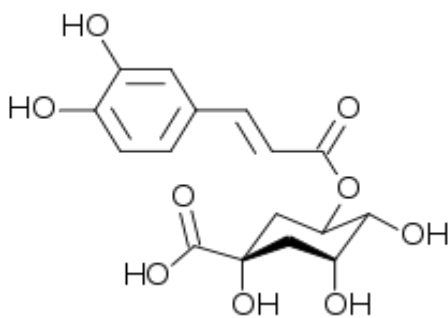


Abb. 3: Chlorogensäure (<http://de.academic.ru>).

1.2.2. Pharmazeutische Wirkungen

Chlorogensäure hat wie andere Polyphenole verschiedene biologische Wirkungen: Sie wirkt antioxidativ, antimutagen (Antitumor-Aktivität) (Kono et al., 1997) und antiinflammatorisch (Li und Chang, 2005). Chlorogensäure und DicaFFEoylchinasäuren haben antivirale Effekte, insbesondere gegen HIV1 (z. B. Zhu et al., 1999; Kwon et al., 2000).

1.2.3. Biosynthese der Chlorogensäure

Die Biosynthese der Chlorogensäure erfolgt (siehe Abb. 2) ausgehend von Chinasäure und 4-Cumaroyl-CoA und wird katalysiert durch die Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat Hydroxycinnamoyltransferase (HQT; Ulbrich und Zenk, 1979; Niggeweg

et al., 2004). 4-Cumaroylchinasäure wird anschließend durch eine 4-Cumaroylchinasäure 3-Hydroxylase zur Chlorogensäure hydroxyliert (Schoch et al., 2001). In einem alternativen Biosyntheseweg, der bislang erst in *Ipomoea batatas* nachgewiesen wurde, dient 4-Cumaroylglucose als aktivierte Hydroxyzimtsäure (Kojima und Villegas, 1984).

1.3. Rutin

1.3.1. Allgemeine Beschreibung

Rutin (auch Rutosid oder Quercetin 3-O-Rutinosid genannt) ist ein Flavonolglycosid des Quercetins mit dem Disaccharid Rutinose (siehe Abb. 4). Sie ist im Pflanzenreich weit verbreitet. Der deutsche Pharmazeut Weiss konnte Rutin 1842 zum ersten Mal aus *Ruta graveolens* (Rutaceae) isolieren. Rutin wird von vielen Pflanzen als gelber Farbstoff zum Schutz gegen UV-Strahlung gebildet.

Rutin kommt in sehr hohen Konzentrationen in *Fagopyrum esculentum* (Polygonaceae) und *Sophora japonica* (Fabaceae) vor. Aus diesen Pflanzen wurde Rutin mit einem Gehalt von bis 20% des Trockengewichts isoliert. Kürzlich wurde Rutin in Aronia-Früchten mit einem Gehalt von 34% des Trockengewichts gefunden (Atanassova und Bagdassarian, 2009).

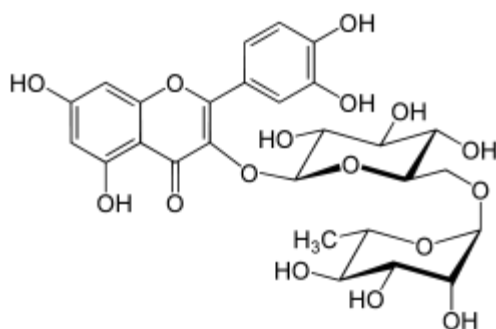


Abb. 4: Struktur von Rutin (<http://en.wikipedia.org>).

1.3.2. Pharmazeutische Wirkungen

Rutin ist das in Schwarzem Tee am meisten vorkommende Flavonol. Es wird pharmazeutisch als Antioxidans verwendet (Olthof et al., 2003). Es wird bei

Erkrankungen der Blutgefäße und bei Darmkrankheiten eingesetzt, zum Beispiel als Wirkstoff in Antihämorrhagika, für Venentherapie (Atanassova und Bagdassarian, 2009) und gegen Schwangerschaftsödeme, weiterhin wirkt es entzündungshemmend bei Colitis. Zu medizinischen Zwecken werden häufig semisynthetische Abwandlungen des Rutins wie Hydroxyethylrutosid, Troxerutin und Oxerutin verwendet (Ritzmann, 2000).

1.3.3. Biosynthese von Rutin

Als Flavonoid entsteht Rutin aus dem Phenylpropanoidstoffwechsel und dem Polyketidstoffwechsel. Das durch die Chalconsynthase und die Chalconisomerase gebildete Flavanon Naringenin wird zum Dihydroflavonol Dihydrokämpferol hydroxyliert. Dieses wird zu Dihydroquercetin hydroxyliert und weiter zum Flavonol Quercetin dehydriert, welches schließlich glycosidiert wird (Abb. 5).

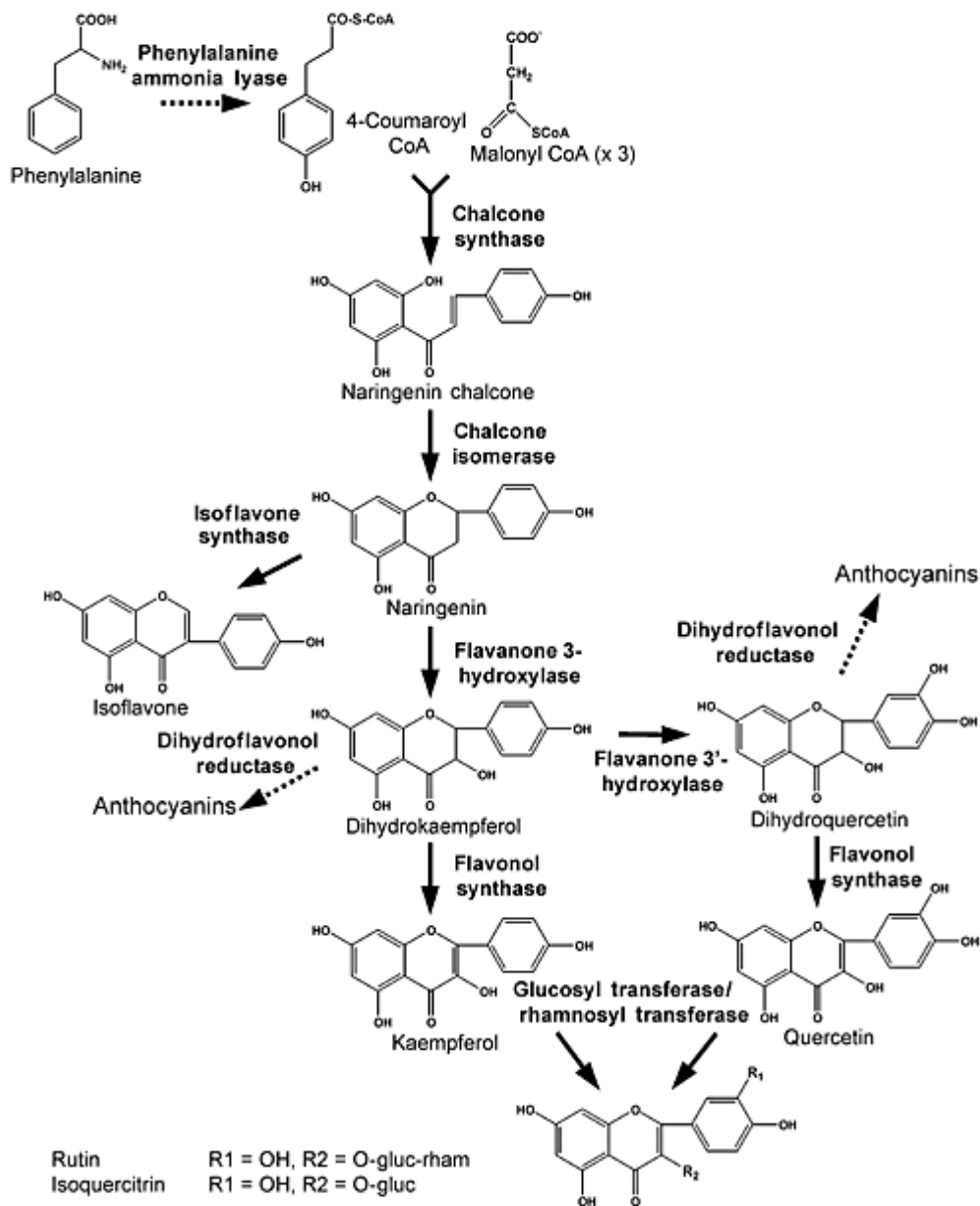


Abb. 5: Biosynthese-Weg von Rutin (aus Shelagh et al. 2001).

1.4. Curcuminoid

1.4.1. Allgemeine Beschreibung

Curcuminoiden sind phenolische Naturstoffe (Abb. 6), die in Rhizomen von *Curcuma* vorkommen. Diese Gattung *Curcuma* gehört zu der Familie Zingiberaceae und ist vor allem in Südostasien verbreitet. *Curcuma*-Arten lassen sich nach dem Vorkommen der drei verschiedenen Curcuminoiden in zwei Typen einordnen:

- Domestica-Typus (*Curcuma domestica*, *Curcuma aromatica*): enthält alle drei Curcuminoiden.
- Xanthorrhiza-Typus (*Curcuma xanthorrhiza*): enthält nur zwei Curcuminoiden.

Alle drei *Curcuma*-Arten haben pharmazeutische Wirkungen. Das verwendete Organ ist das Rhizom, weil dort Curcuminoiden und ätherische Öle am höchsten enthalten sind. Gemahlenes Rhizom von *Curcuma longa* ist ein Hauptbestandteil von Curry.

1.4.2. Pharmazeutische Wirkungen

Curcuma wird sehr oft in der alternativen Medizin verwendet, zum Beispiel gegen Lebererkrankungen und Rheuma (Miquel et al., 2002). Curcuminoiden sind entzündungshemmend und haben Antitumor- sowie antiulzerative Wirkung (Claeson et al., 1994; Joe et al., 2004). Die ätherischen Öle in *Curcuma* wirken antifungal und antimikrobiell sowie gegen Tumoren (Asolkar et al., 1992).

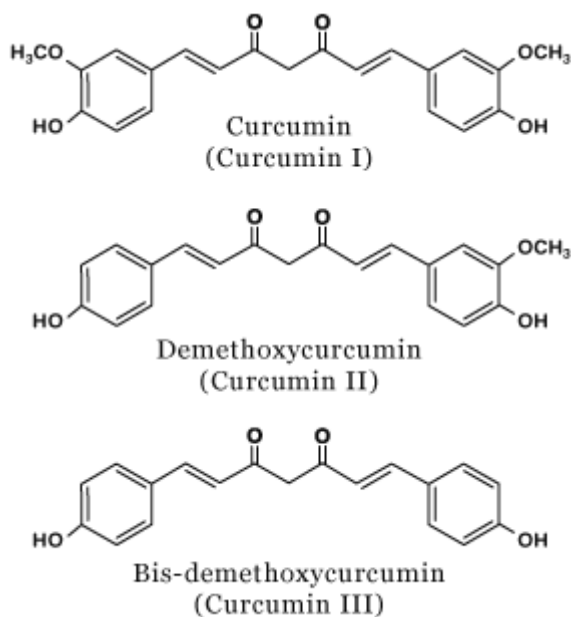


Abb. 6: Struktur von Curcuminoiden (<http://curcumin-turmeric.net/>).

1.5. Gingerole

1.5.1. Allgemeine Beschreibung

Gingerole sind phenolische Naturstoffe (Abb. 7), die vor allem im Rhizom von *Zingiber officinale* vorkommen. *Zingiber* gehört zu der Familie Zingiberaceae, die meist tropisch verbreitet sind. Das üblicherweise verwendete Organ ist das Rhizom, das phenolische Stoffe sowie ätherische Öle enthält.

1.5.2. Pharmazeutische Wirkungen

In der Alternativmedizin wird Ingwerrhizom oft gegen Erkältungssymptome, Rheuma und Verdauungsstörungen angewendet. Die Inhaltsstoffe wirken antibakteriell, antifungal und entzündungshemmend. Sie hemmen die Prostaglandin- und Leukotriensynthese, und werden als Schmerzmittel sogar auch bei Nervenschmerzen eingesetzt (Mascolo et al., 1989; Mustafa et al., 1993). Eine antitumorale Wirkung wurde gegen Darm- und Ovarialkrebs beschrieben (Lee et al., 2008; Rhode et al., 2007). Ingwerrhizom wird gegen Übelkeit und Erbrechen bei Schwangerschaft (Ernst und Pittler, 2004), Reisekrankheit und bei Chemotherapiepatienten (Ryan et al., 2009) eingesetzt. Ingwerpräparate besitzen auch eine anti-ulceröse Eigenschaft (Goel und Sairam, 2001).

Weiterhin wurde bei Tieren festgestellt, dass Ingwerextrakte auf den Blutzucker- und Blutfettspiegel wirken (Bahandari et al., 1998; Al-Amin et al., 2006).

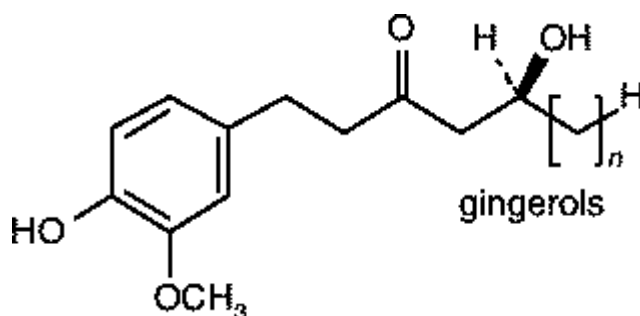


Abb. 7: Struktur der Gingerole ($n = 1,2,3,4,6,8,10$; $n = 4$: Gingerol-6 (aus: WHO Monographs on Selected Medicinal Plants - Volume 1, 1999).

Gingerol-6 stellt das scharfe Prinzip dar, wohingegen die Gingerole-8 und -10 keine scharfe Wirkung haben (Hänsel und Sticher, 2006).

1.5.3. Biosynthese der Curcuminoide und Gingerole

Erste Untersuchungen zur Biosynthese der Curcuminoide wurden von Denniff und Whiting 1976 durchgeführt. Sie postulierten, dass die Curcuminoide und Gingerole Phenylpropanderivate sind. Brand et al. (2006) vertraten die Ansicht, dass Curcuminoide durch Kondensation von zwei Molekülen *p*-Cumaroyl-CoA und einem Molekül Malonyl-CoA geformt werden, so dass Bisdemethoxycurcumin entsteht, welches über Demethoxycurcumin in Curcumin transformiert wird. Ramirez-Ahumada et al. (2006) konnten die Biosynthese der Curcuminoide auf enzymatischer Ebene aufklären: Durch Kondensation von zwei Molekülen 4-Cumaroyl-CoA und einem Molekül Malonyl-CoA unter zweifacher Decarboxylierung durch eine Polyketidsynthase entsteht Bisdemethoxycurcumin, das durch anschließende Hydroxylierungen und Methylierungen über Demethoxycurcumin zu Curcumin umgewandelt wird. Alternativ könnte die Kondensation auch über Feruloyl-CoA erfolgen. Eine ähnliche Polyketidsynthase könnte bei der Biosynthese der Gingerole beteiligt sein, bei der ein Molekül 4-Cumaroyl- bzw. Feruloyl-CoA mit Hexanoyl-CoA kondensiert werden sollte. Im Anschluss daran muss eine Reduktion der Doppelbindungen erfolgen. Diese Biosynthese konnte von Ramirez-Ahumada et al. (2006) nicht auf Enzymebene nachgewiesen werden.

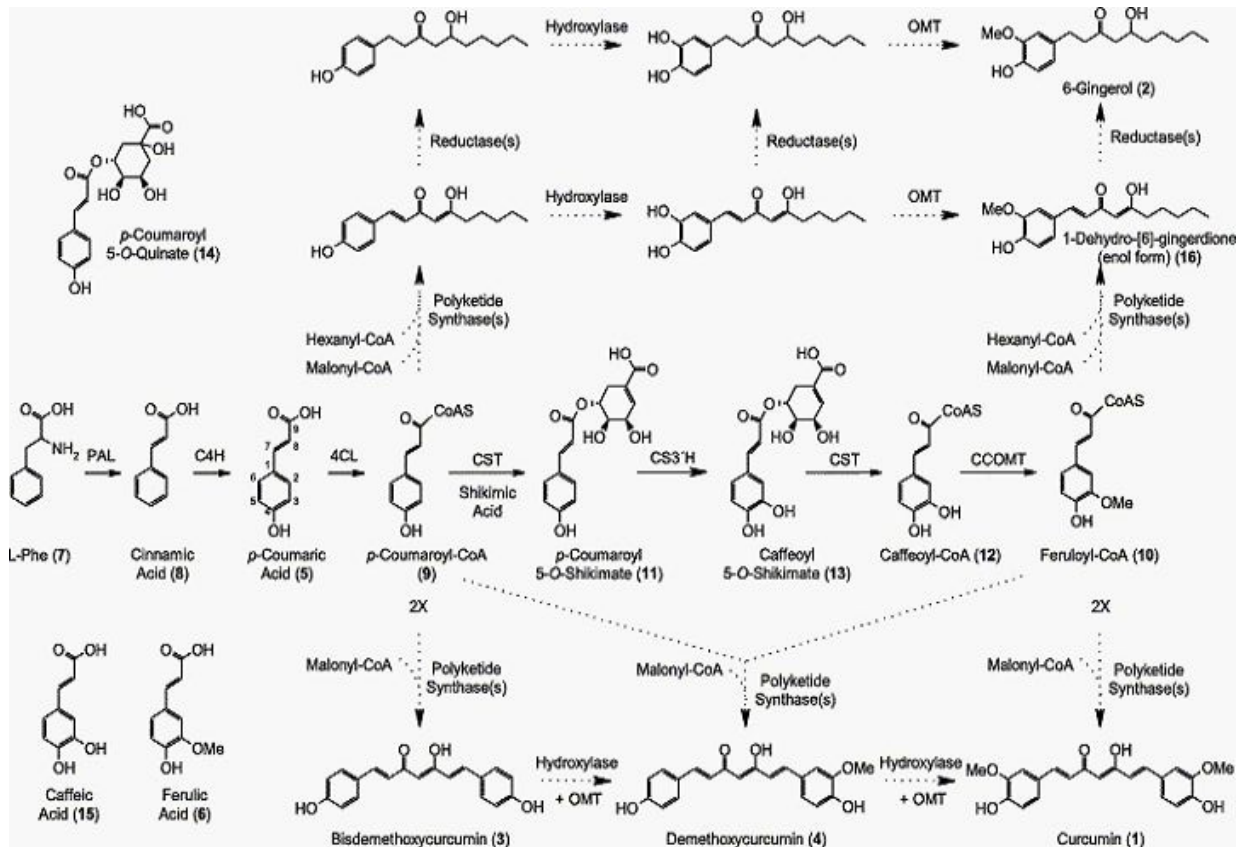


Abb. 8: Vorgeschlager Biosyntheseweg der Curcuminoide und Gingerole bei Gelbwurz und Ingwer nach Ramirez-Ahumada et al. (2006): Die katalytischen Enzyme sind: PAL = Phenylalanin Ammoniak-Lyase; C4H = Zimtsäure 4-Hydroxylase; 4CL = Hydroxyzimtsäure:CoA-Ligase (4-Cumarat:CoA-Ligase); CST = *p*-Cumaroyl:Shikimat Transferase; CS3'H = *p*-Cumaroyl-5-O-Shikimat 3'-Hydroxylase; OMT = O-Methyltransferase; CCOMT = Caffeoyl-CoA O-Methyltransferase. Alle Umwandlungen wurden bereits in anderen Arten nachgewiesen, mit Ausnahme der von den Polyketid-Synthasen, den Reduktasen, den Hydroxylasen und den OMT katalysierten Reaktionen, bei denen Bisdemethoxycurcumin (3) über Demethoxycurcumin (4) in Curcumin (1) umgewandelt wird (gestrichelte Pfeile).

1.5.4. Zellkulturen

Aus *Curcuma*

Aufgrund der wichtigen biologischen Effekte der Curcuminoiden wurde bereits seit vielen Jahren versucht, *in vitro*-Kulturen von *Curcuma* anzulegen. Yasuda et al. legten bereits 1987 Kalluskulturen von *Curcuma zedoria* an und untersuchten mit Gaschromatographie untersucht, ob der Kallus ätherische Öle wie z. B. Cineol bildet, das von der Mutterpflanze produziert wird. Der Kallus produzierte kein Cineol, wohl aber in *in vitro* regenerierte Pflanzen. Salvi et al. (2001) konnten aus Blatt-Kalluskulturen von *Curcuma longa* Pflanzen regenerieren. Sakui et al. (1992) nutzten Suspensionskulturen von *Curcuma zedoaria* zur Biotransformation von Sesquiterpenen. Aus *Curcuma longa* und *Curcuma aromatica* wurden Mikrorhizome gewonnen (Nayak, 2000; Shirkurkar et al., 2001).

Aus *Zingiber*

Aufgrund der wichtigen biologischen Wirkungen von *Zingiber* wurde schon früh versucht, davon auch Zellkulturen anzulegen. Bis jetzt wurde das Vorkommen von Gingerolen in diesen Zellkulturen noch nicht beschrieben (Anasori und Asghari, 2008).

1.6. Klassifikation des Pflanzenreichs

In dem folgenden Teil der Einleitung ist der aktuelle Stand der Klassifikation des Pflanzenreichs mit Beschreibungen der in dieser Arbeit untersuchten Ordnungen und Familien. Der größte Teil der Informationen stammen aus Strasburger – Lehrbuch der Botanik (Bresinsky et al., 2008) und der jüngsten Veröffentlichung der Angiosperm Phylogeny Group (AGP III, 2009).

1.6.1. „Farne“

1.6.1.1. Ordnung Polypodiales

Die Polypodiales sind eine Ordnung der Farne, die folgende Familien umfasst:

Blechnaceae, Aspleniaceae, Athyriaceae, Cystopteridaceae, Onocleaceae, Thelypteridaceae und Woodsiaceae.

Die Blechnaceae (Rippenfarngewächse) sind eine monophyletische Familie (Cranfill 2001), sie hat also eine gemeinsame Stammform und umfasst alle Untergruppen, die sich von dieser Stammform herleiten. Nach bisherigen Ergebnissen umfasst sie die neun Gattungen *Blechnum*, *Brainea*, *Doodia*, *Pteridoblechnum*, *Sadleria*, *Salpichlaena*, *Steenisioblechnum*, *Stenochlaena* und *Woodwardia* mit ca. 200 Arten (Smith et al., 2006).

1.6.2. Klassifikation der Angiospermen

Die Angiospermen (bedecktsamige Pflanzen) enthalten ca. 250.000 bekannte Arten, die nach der phylogenetischen Klassifikation (APG) geordnet sind. Diese Klassifikation wurde in den 1990er Jahre begründet, im Jahr 2003 wurde eine neue Version davon publiziert, und im Jahr 2009 ist die dritte Version erschienen (APGIII, 2009); dieser Stammbaum ist in Abb. 9 dargestellt.

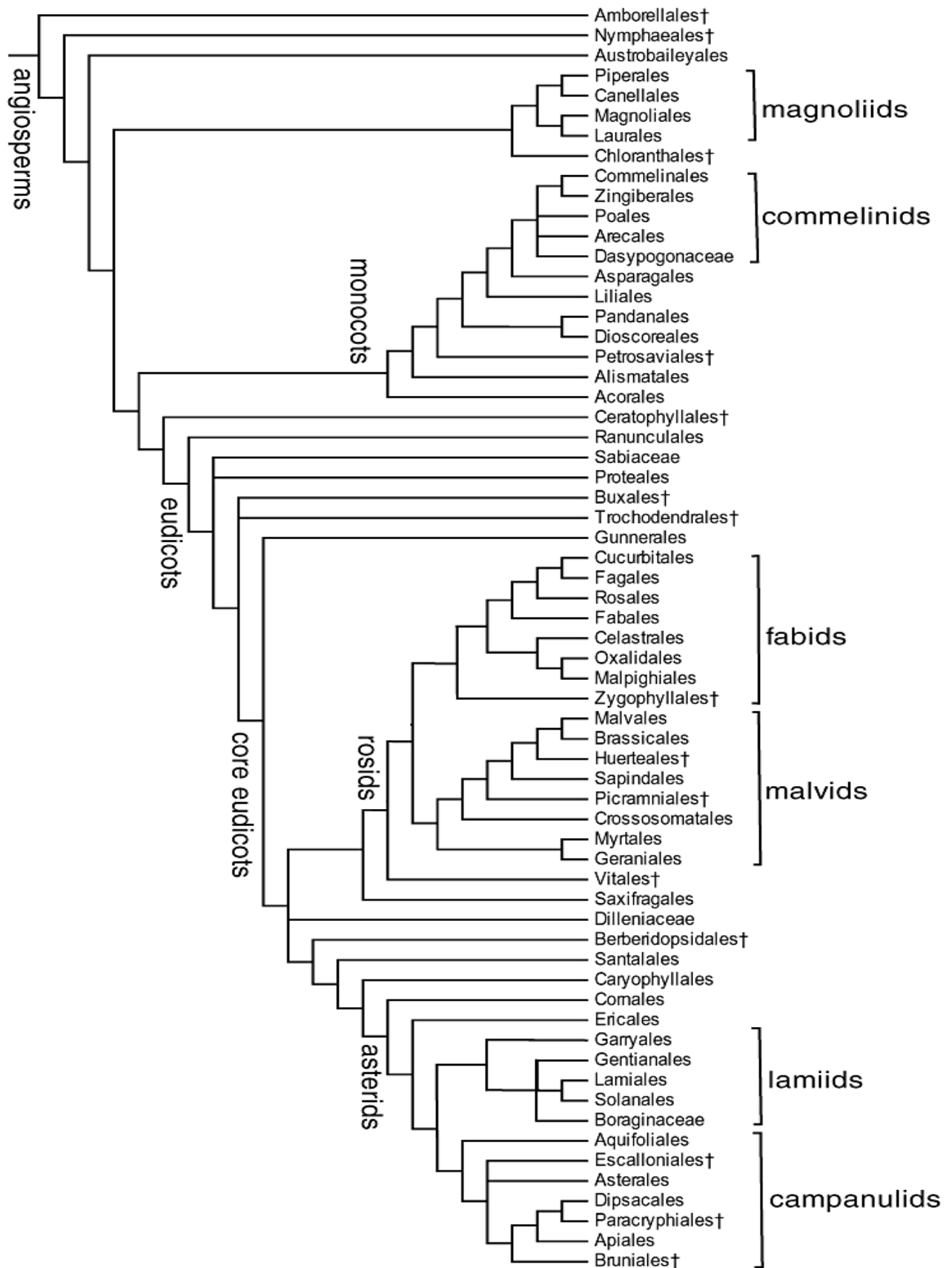


Abb. 9: Angiospermen-Klassifikation der Angiosperm Phylogeny Group (APG III, 2009). † markiert neu erkannte Ordnungen.

1.6.2.1. Monokotyledonen

Die Monokotyledonen (Einkeimblättrigen) sind schon seit langem gut charakterisiert. Häufig sind es krautige Pflanzen. Die einkeimblättrigen Pflanzen werden in 11 Ordnungen eingeteilt:

Acorales, Alismatales, Petrosaviales, Dioscoreales, Pandanales, Liliales, Asparagales, Arecales, Poales, Commelinales und Zingiberales sowie die Familie der Dasypogonaceae (Bresinsky et al., 2008).

1.6.2.1.1. Ordnung Alismatales (Froschlöffelartige)

Die Alismatales sind häufig krautige Pflanzen feuchter oder aquatischer Standorte. Diese Ordnung ist in 13 Familien unterteilt. Dazu gehört die Familie **Araceae** (Aronstabgewächse), die 106 Gattungen und ca. 4025 Arten umfasst und krautige, aber auch holzige Pflanzen beinhaltet. Eine weitere Familie sind die **Juncaginaceae** (Dreizackgewächse) mit 4 Gattungen und 15 bis 25 Arten.

1.6.2.1.2. Ordnung Liliales (Lilienartige)

Die Ordnung Liliales umfasst 10 Familien. Zu den **Liliaceae** (Liliengewächsen) gehören 16 Gattungen und ca. 630 Arten, die fast alle ausdauernde krautige Pflanzen sind.

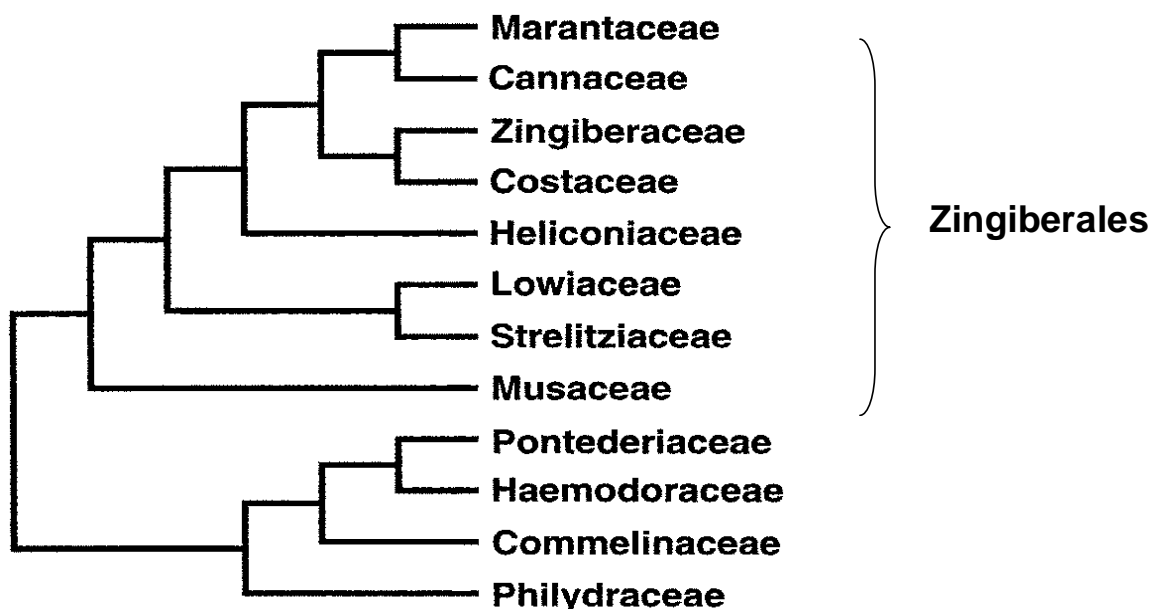
1.6.2.1.3. Ordnung Poales (Süßgrasartige)

Die Poales enthalten nach APG III 16 Familien. Die Familie **Juncaceae** (Binsengewächse) umfasst 7 Gattungen und ca. 430 Arten, davon ist *Juncus* weltweit verbreitet. Die Juncaceae sind ausdauernde krautige Pflanzen, wenige davon sind einjährig.

1.6.2.1.4. Ordnung Zingiberales (Ingwerartige)

Zu den Zingiberales werden heutzutage acht Familien gezählt, und zwar die Schwesterfamilien **Zingiberaceae** und **Costaceae**, die Schwesterfamilien

Kress et al. (2001; Abb. 10) schlagen die Aufteilung der Zingiberales in eine Terminalklade mit zwei Abstammungslinien vor, einerseits die Schwesterfamilien Marantaceae und Cannaceae und andererseits die Schwesterfamilien Zingiberaceae und Costaceae. Darüber hinaus existieren vier weitere Abstammungslinien, die paraphyletischen Familien Heliconiaceae, Lowiaceae, Strelitziaceae und Musaceae. In Abb. 10 wurden verwandte Gruppen (Commelinaceae, Philydraceae, Haemodoraceae, Pontederiaceae) als Außengruppen mit einbezogen.



Die **Cannaceae (Blumenrohrgewächse)** enthalten eine einzige Gattung (*Canna*) mit 10 bis 20 Arten, die neotropisch verbreitet sind. Pflanzen dieser Familie werden als Zier- und Nahrungspflanzen verwendet.

Die **Heliconiaceae (Helikoniengewächse)** enthalten nur eine Gattung (*Heliconia*) mit 100 bis 225 Arten, die als Zierpflanzen verwendet werden. Die meisten kommen

in der Neotropis vor und einige in Ozeanien. Früher wurden die Arten dieser Familie in die Strelitziaceae oder Musaceae eingegliedert.

Die **Lowiaceae** bestehen aus einer einzigen Gattung (*Orchidanta*) mit 12 bis 16 Arten, die rein süd- und südostasiatisch verbreitet sind. Früher waren diese Arten als Unterfamilie Lowioideae in die Familie der Musaceae eingeordnet.

Die **Musaceae (Bananengewächse)** enthalten nur drei Gattungen mit insgesamt 35 bis 42 Arten. Diese Pflanzenarten sind tropisch und subtropisch und von Westafrika über Indien bis zum Pazifik verbreitet. Ihr Hauptverbreitungsgebiet ist Südostasien. Früher wurden noch weitere Gattungen (aus den Heliconiaceae, Strelitziaceae und Lowiaceae) dieser Familie zugeordnet.

Die Familie der **Marantaceae (Pfeilwurzgewächse)** wird als Schwestergruppe der Cannaceae angesehen (Andersson und Chase, 2001). Sie besteht aus 31 Gattungen mit ca. 535 Arten (Prince und Kress, 2006). Die Familie ist weltweit in allen tropischen Regionen außer in Australien vertreten. Andersson (1998) unterteilte die Familie aufgrund der morphologischen Eigenschaften in fünf informelle Gruppen, in die *Phrynium*-, *Maranta*-, *Calathea*-, *Myrosma*- und die *Donax*-Gruppe. Bei einigen Gattungen war die Zuordnung allerdings unsicher. Die Ergebnisse von molekularbiologischen Untersuchungen des *rps16*-Introns der Plastiden-DNA unterstützten diese vorherige Einteilung nicht (Andersson und Chase, 2001). Die meisten der zuvor festgelegten Gruppen erwiesen sich als para- oder polyphyletisch. Prince und Kress (2006) verwendeten andere Plastidensequenzen (*matK*, *trnL-F*) zur Aufklärung der Verwandtschaft innerhalb der Marantaceae. Auf der Grundlage ihrer Befunde identifizierten sie fünf Hauptkladen (*Calathea*, *Donax*, *Maranta*, *Stachyphrynium*, *Sarcophrynium*) und zeigten auf, dass vier bedeutende Gattungen (*Calathea*, *Marantochloa*, *Phrynium*, *Schumannianthus*) nicht monophyletisch sind. Die Gattung *Calathea* wurde in zwei Gruppen innerhalb der *Calathea*-Klade aufgespalten. Die beiden untersuchten *Schumannianthus*-Arten wurden in unterschiedliche Kladen eingeordnet, *Schumannianthus virgatus* in die *Maranta*-Klade und *Schumannianthus dichotomus* in die *Donax*-Klade. Die phylogenetischen Zweige der Gattungen *Marantochloa* (*Stachyphrynium*-Klade) und *Phrynium* (*Donax*-Klade) wurden mit anderen Gattungen durchmischt.

Die **Strelitziaceae (Strelitziengewächse)** enthalten 3 Gattungen mit 7 Arten, die als Zierpflanzen verwendet werden und im Tropengürtel zu finden sind. Laut molekularbiologischen Untersuchungen sind die Strelitziaceae die Schwesterfamilie der Lowiaceae und nahe verwandt mit den Familien Heliconiaceae und Musaceae.

Die **Zingiberaceae (Ingwergewächse)** bilden die größte Familie der Zingiberales. Die Familie enthält 52 bis 53 Gattungen mit 1200 bis 1300 Arten. Viele davon sind tropische Zierpflanzen, einige Gewürze und Heilpflanzen (Ingwer und Curcuma).

1.6.2.2. Eudikotyledonen

Die Eudikotyledonen umfassen einen Großteil der zweikeimblättrigen Blütenpflanzen. Sie sind kein eigenes Taxon nach APG. Diese Gruppe ist die Schwestergruppe der Ceratophyllales, die früher unter der Klasse Dreifurchenpollen-Zweikeimblättrige geführt wurden. Zu den Eudikotyledonen gehören die basalen Eudikotyledonen (Ranunculales, Proteales, Trochodendrales, Buxales und die Familie Sabiaceae) und die Kerneudikotyledonen mit den Rosiden und den Asteriden.

1.6.2.2.1. Rosiden

Sie sind eine der zwei großen Gruppen der Eudikotyledonen und wurden früher in der Unterklasse Rosenähnliche geführt. Sie haben wenige gemeinsame morphologische Merkmale, aber sie sind durch gemeinsame molekulargenetische Merkmale charakterisiert. Sie umfassen zwei große Gruppen, die Eurosiden I und die Eurosiden II, sowie eine basal stehende Ordnung (Vitales).

1.6.2.2.2. Eurosiden I (Fabiden)

1.6.2.2.2.1. Ordnung Celastrales (Spindelbaumartige)

Die Celastrales sind krautige oder verholzende Pflanzen. Diese Gruppe enthält zwei Familien. Sie ist in der Gruppe der Eurosiden I das Schwestertaxon zu den Ordnungen Malpighiales und Oxalidales.

Die **Celastraceae (Spindelbaumgewächse)** sind meist in den Tropen verbreitet. Diese Familie enthält 100 Gattungen mit 1200 bis 1300 Arten. Die Celastraceae sind verholzende Pflanzen, Sträucher, Bäume oder Lianen. Viele Arten werden als Zierpflanzen und auch zur Holzgewinnung genutzt.

1.6.2.2.2. Ordnung Cucurbitales (Kürbisartige)

Die Cucurbitales haben sieben weltweit verbreitete Familien und sind Bäume und Sträucher sowie krautige Pflanzen. Die bekanntesten Arten gehören zu den Cucurbitaceae.

Die **Cucurbitaceae (Kürbisgewächse)** sind meist krautige Pflanzen. Sie enthalten 130 Gattungen mit 800 Arten und sind in zwei Unterfamilien gegliedert. Die Arten sind tropisch und subtropisch verbreitet. Viele Arten haben wirtschaftliche Bedeutung als Nutzpflanzen (z. B. Kürbis *Cucurbita pepo*, Gurke *Cucumis sativus*, Wassermelone *Citrullus lanatus*).

1.6.2.2.3. Eurosiden II (Malviden)

1.6.2.2.3.1. Ordnung Geraniales (Storachschnabelartige)

Die Geraniales sind oft krautige Pflanzen, einige sind aber auch verholzend. Diese Gruppe der Eurosiden II ist die Schwestergruppe der Myrtales und umfasst drei Familien (APG III, 2009).

Die **Geraniaceae (Storachschnabelgewächse)** sind in gemäßigten oder warmen Klimazonen verbreitet. Manche Arten werden als Zierpflanzen verwendet und manche zur Gewinnung von pharmazeutischen und kosmetischen Produkten (*Pelargonium reniforme*, *P. sidoides*). Diese Familie enthält fünf bis sechs Gattungen mit 750 bis 805 Arten. Die artenreichsten Gattungen sind *Geranium*, *Pelargonium* und *Erodium*.

1.6.2.2.3.2. Ordnung Myrtales (Myrtenartige)

Unter den Myrtales sind verholzende sowie krautige Pflanzen vertreten. Die Gruppe umfasst neun Familien (APG III, 2009).

Die **Lythraceae (Weiderichgewächse, Blutweiderichgewächse)** sind in den gemäßigten Zonen und in den Tropen zu finden. In der Familie kommen Farbstoffe vor, wie zum Beispiel im Hennastrauch (*Lawsonia inermis*), aus dem Henna gewonnen wird. Die Familie ist in fünf Unterfamilien gegliedert. Sie enthält 31 Gattungen mit 620 bis 650 Arten.

Die **Onagraceae (Nachtkerzengewächse)** sind ursprünglich in Amerika beheimatet und heutzutage weltweit verbreitet. Diese Familie ist in zwei Unterfamilien gegliedert und enthält 17 bis 24 Gattungen mit 650 Arten. Die Arten sind meist krautige Pflanzen oder Sträucher und selten Bäume und werden meist als Zierpflanzen verwendet.

1.6.2.2.3.3. Ordnung Malvales (Malvenartige)

Die Malvales enthalten Nutz- und Zierpflanzen. Sie sind weltweit verbreitet. Sie umfassen zehn Familien. Innerhalb der Eurosiden II sind die Malvales die Schwestergruppe der Brassicales.

Die **Malvaceae (Malvengewächse)** sind in neun Unterfamilien gegliedert. Sie enthalten 243 Gattungen mit 4225 bis 4300 Arten, die als Nutz- und Zierpflanzen verwendet werden (z. B. *Abutilon*, *Bombax*, *Lavatera*). Einige Arten werden auch medizinisch genutzt (z. B. *Tilia*). Neben krautigen Arten treten auch verholzende Sträucher und Bäume auf. Die bekanntesten Arten sind der Kakaobaum (*Theobroma cacao*) und die Baumwolle (*Gossypium hirsutum*). Vor Kurzem wurden drei Familien (Tiliaceae, Bombaceae und Sterculiaceae) in die Malvaceae eingegliedert.

Die **Thymelaeaceae (Seidelbastgewächse oder Spatzenzungengewächse)** sind weltweit verbreitet. Es sind meist verholzende Sträucher und Bäume, selten krautige Pflanzen. Wenige Arten werden als Zierpflanzen verwendet, die meisten zur Holzgewinnung oder zur Herstellung von Räucherwerk. Diese Familie ist in zwei Unterfamilien und eine Gattung gegliedert, insgesamt sind es 50 bis 60 Gattungen mit 500 bis 800 Arten.

1.6.2.2.4. Asteriden

Die Asteriden gehören zu den Eudikotyledonen als eine der zwei großen Gruppen. Sie umfassen die beiden großen Gruppen Lamiiden und Campanuliden und Euasteriden II sowie die Ordnungen Cornales und Ericales.

1.6.2.2.4.1. Ordnung Cornales (Hartriegelartige)

Die Cornales enthalten sechs Familien. Die Pflanzen dieser Ordnung sind Halbsträucher, Sträucher, Bäume, Lianen oder krautige Pflanzen, die in den gemäßigten Zonen bis in die Subtropen verbreitet sind. Die Cornales sind die basalste Gruppe der Asteriden, daher sind sie die Schwestergruppe der anderen Asteriden.

Die Familie der **Cornaceae (Hartriegelgewächse)** besteht aus zwei Gattungen mit 85 Arten, die meist in gemäßigten Zonen und Berggebieten (Tropen und Subtropen) verbreitet sind. Die Arten werden wegen ihrer Blüten, die mit attraktiven Hochblättern umhüllt sind, sowie der roten Farbe des Herbstlaubes als Ziergehölze verwendet.

Die **Hydrangeaceae (Hortensiengewächse)** sind in zwei Unterfamilien (Jamesioideae, Hydrangeoideae) gegliedert und enthält 17 Gattungen mit 220 Arten. Sie sind in nördlichen gemäßigten Zonen und in Subtropen verbreitet.

1.6.2.2.5. Euasteriden I (Lamiiden)

Die **Boraginaceae (Raublattgewächse oder Borretschgewächse)** beinhalten 148 bis 156 Gattungen mit 2740 Arten, die weltweit vertreten sind. Die meisten sind ein- bis mehrjährige krautige Pflanzen, Sträucher und Bäume. Nach APG III sind die Boraginaceae noch keiner Ordnung zugeteilt, aber in APG III (2009) wurden die Holpestigmataceae den Boraginaceae zugeordnet.

Die Boraginaceae wurden anhand molekularphylogenetischer Daten (APG III, 2009) in Unterfamilien eingeteilt: Boraginoideae, Cordioideae, Ehretioideae, Heliotropoideae, Hydrophylloideae und Lennooideae. Die Boraginoideae sind vorwiegend krautige Pflanzen, wogegen in den anderen vier Unterfamilien auch baumförmige Vertreter vorkommen (Bresinsky et al., 2008).

1.6.2.2.5.1. Ordnung Gentianales (Enzianartige)

Die Gentianales enthalten viele verschiedene Pflanzenformen: Man findet in dieser Ordnung Gehölze von Lianen über Sträucher bis zu Bäumen, krautige Pflanzen und Sukkulente.

Die **Apocynaceae (Hundsgiftgewächse)** sind aufgrund phylogenetischer Erkenntnisse in fünf Unterfamilien gegliedert (Apocynoideae, Asclepiadoideae, Rauvolfioideae, Periplocoideae, Secamonoideae) und umfassen 415 Gattungen mit über 4500 Arten, die in den gemäßigten Zonen, den Tropen und Subtropen verbreitet sind.

Die **ehemaligen Asclepiadaceae (Seidenpflanzengewächse)** wurden nun den Apocynaceae zugeordnet (Bresinsky et al., 2008).

Die **Gentianaceae (Enziangewächse)** enthalten 80 bis 87 Gattungen mit 900 bis 1655 weltweit verbreiteten Arten. Sie sind meist ein- bis mehrjährige krautige Pflanzen und selten verholzende Pflanzen, also Sträucher, Bäume oder Lianen.

Rubiaceae (Rötegewächse, Krappgewächse oder Kaffeegewächse)

Die Familie der Rubiaceae besteht aus 611 bis 618 Gattungen mit 13150 Arten. Fünf Gattungen sind in Mitteleuropa vertreten, die anderen sind in den Tropen und Subtropen zu finden. Die meisten sind Sträucher und Bäume in den Tropen, in den gemäßigten Breiten handelt es sich überwiegend um krautige Pflanzenarten.

Die wichtigsten Arten sind die Kaffeepflanzen (*Coffea arabica*) und die Arten, die Chinin enthalten, ansonsten werden die Arten als Zierpflanzen benutzt.

1.6.2.2.5.2. Ordnung Lamiales (Lippenblütenartige)

Die Lamiales sind die Schwestergruppe der Solanales. Diese Gruppe umfasst 23 Familien. Es handelt sich meist um ein- oder mehrjährige krautige Pflanzen, einige Taxa sind Bäume und Sträucher.

Die **Acanthaceae (Akanthusgewächse)** sind eine tropische Familie mit meist ausdauernden Pflanzen. Es gibt krautige Taxa und verholzende Taxa. Diese Familie ist in vier Untergruppen gegliedert und umfasst 229 bis 250 Gattungen mit 3500 bis

4000 Arten. Die verschiedenen Arten werden als Heilpflanzen, Zierpflanzen und Nutzpflanzen verwendet.

Die **Gesneriaceae (Gesneriengewächse)** sind ebenfalls eine tropische Familie. Diese Familie enthält 12 Tribus mit 147 bis 160 Gattungen und 3200 bis 3870 Arten mit ausdauernden Halbsträuchern, Sträuchern und kleinen Bäumen. Die Arten werden als Zierpflanzen genutzt, z. B. die Gloxinien (*Sinningia*) und das Usambaraveilchen (*Saintpaulia*).

Die **Lamiaceae oder Labiatae (Lippenblütengewächse)** sind weltweit verbreitet. Sie sind in sieben Unterfamilien gegliedert und umfassen 230 Gattungen mit mehr als 7000 Arten. In dieser Familie gibt es einjährige bis ausdauernde krautige Pflanzen, Halbsträucher, Sträucher, Bäume oder Lianen. In einigen Unterfamilien der Lamiaceae treten verstärkt ätherische Öle auf. Daher werden viele Arten wegen ihrer aromatischen Öle und als Gewürzpflanzen verwendet, andere Arten werden als Zierpflanzen benutzt.

Diese Familie wurde aufgrund morphologisch-kladistischer Untersuchungen von Cantino et al. (1992) in acht Unterfamilien gegliedert. Später wurde die Klassifikation aufgrund verschiedener molekularer Untersuchungen von Wagstaff et al. (1998) basierend auf der Analyse von *rbcL*- und *ndhF*-Sequenzdaten in die sieben folgenden Unterfamilien gegliedert: Teucrioideae, Viticoideae, Scutellarioideae, Lamioideae, Pogostemonoideae, Chloanthoideae, Nepetoideae, wobei die ehemalige Unterfamilie Ajugoideae (Cantino et al., 1992) in die Teucrioideae eingegliedert wurde. Die neueste Klassifizierung nach Olmstead et al. (2005) identifiziert nur noch fünf Unterfamilien: Teucrioideae, Scutellarioideae, Prostantheroideae, Nepetoideae und Viticoideae. Rosmarinsäure kommt in den Lamiaceae oft vor, insbesondere in der Unterfamilie Nepetoideae, aber auch vereinzelt in Teucrioideae und in Arten anderer Unterfamilien (Pedersen 2000). Chlorogensäure wurde ebenfalls in verschiedenen Unterfamilien (Nepetoideae, Teucrioideae und Viticoideae) gefunden, unabhängig von Rosmarinsäure.

Die **Oleaceae (Ölbaumgewächse)** enthalten 25 Gattungen mit 900 Arten, die weltweit verbreitet sind. Meist sind es Sträucher oder Bäume und manchmal Lianen. Von manchen Arten werden Duftöle (Jasminöl) gewonnen. Oliven und Olivenöl werden als Nahrungsmittel genutzt.

Die **Plantaginaceae (Wegerichgewächse)** enthalten zwölf Tribus mit 92 Gattungen und 2000 Arten, der größte Teil davon wurde früher zu den Scrophulariaceae gerechnet. Neue phylogenetische Untersuchungen mit molekularbiologischen Methoden haben zu der erweiterten Familie Plantaginaceae geführt (Olmstead et al., 2001). Diese Familie ist heterogen zusammengesetzt, manche Arten sind einjährige bis ausdauernde krautige Pflanzen, selten Sträucher, und einige sind Wasserpflanzen.

Die **Scrophulariaceae (Braunwurzgewächse, Rachenblütler)** enthalten neun Tribus mit 52 Gattungen und 1700 weltweit verbreiteten Arten. Die meisten sind krautige Pflanzen, verholzende Arten treten ebenfalls auf.

Die **Verbenaceae (Eisenkrautgewächse)** enthalten 30 bis 35 Gattungen mit 1200 Arten. Viele dieser Arten wurden früher zu den Lamiaceae oder Acanthaceae gerechnet. Molekularbiologische Untersuchungen haben aber zu dieser neuen Familieneinteilung geführt. Die Arten sind meist krautige Pflanzen oder Sträucher, selten Bäume oder Lianen. Sie sind in den gemäßigten Zonen, Tropen und Subtropen verbreitet.

1.6.2.2.5.3. Ordnung Solanales (Nachtschattenartige)

Die Solanales sind die Schwestergruppe der Lamiales. Sie umfasst fünf Familien, in denen verholzende und krautige Pflanzen enthalten sind.

Die **Convolvulaceae (Windengewächse)** enthalten zwölf phylogenetische Tribus mit 55 bis 60 Gattungen und 1600 bis 1700 Arten, die weltweit verbreitet sind, insbesondere in den Tropen. Die Windengewächse sind meist ausdauernde krautige Kletterpflanzen oder verholzende Lianen und selten Sträucher oder Bäume, diese Arten werden als Nahrungsmittel (z. B. Süßkartoffel *Ipomoea batatas*) oder als Zierpflanzen (z. B. Prunkwinde *Ipomoea tricolor*) verwendet.

Die **Solanaceae (Nachtschattengewächse)** beinhalten 90 bis 100 Gattungen mit 2700 Arten. Die Arten werden als Nahrungspflanzen (Kartoffel, Tomate, Paprika), Zierpflanzen oder auch wegen der enthaltenden Alkaloide und Steroide als Medizin und Kultpflanzen verwendet (*Hyoscyamus niger*, *Datura*-Arten, *Atropa belladonna*, *Solanum nigrum*, *Cestrum laevigatum*). Die Arten sind ein- bis mehrjährige Pflanzen, krautig oder auch verholzend und über die ganze Welt verbreitet. Diese Gruppe ist nach molekularphylogenetischen Untersuchungen basierend auf der Analyse von

ndhF- und *trnL*F-Sequenzen (Olmstead et al., 2008) in folgende Unterfamilien aufgeteilt: Goetzeoideae, Benthamielleae, Cestroideae, Petunieae und die "x = 12 Klade" (ohne Rang), welche die Schwestergruppen Nicotianoideae und Solanoideae umfasst.

1.6.2.2.6. Euasteriden II (Campanuliden)

1.6.2.2.6.1. Ordnung Apiales (Doldenblütlerartige)

Diese Gruppe ist weltweit verbreitet und enthält sieben Familien mit krautigen oder verholzenden Pflanzen.

Die **Apiaceae (Doldenblütler oder Doldengewächse)** sind meist mehrjährige krautige Pflanzen in 434 Gattungen mit 3780 Arten, die weltweit verbreitet sind. Viele dieser Arten sind aufgrund ihrer ätherischen Öle Gewürz-, Heil- und Nahrungspflanzen, einige sind auch sehr giftig. Die Familie ist in vier Unterfamilien gegliedert: Mackinlayoideae, Azorelloideae, Saniculoideae und Apioideae.

Die **Araliaceae (Araliengewächse)** sind in zwei Unterfamilien gegliedert (Aralioideae und Hydrocotyloideae). Sie enthalten 43 Gattungen mit 1450 Arten, die überwiegend tropisch verbreitet sind. Meist sind es verholzende Pflanzen.

1.6.2.2.6.2. Ordnung Aquifoliales (Stechpalmenartige)

Die Aquifoliales sind die basalste Gruppe der Euasteriden II. Sie umfassen fünf Familien, die meist in den Tropen vorkommen.

Die **Aquifoliaceae (Stechpalmengewächse)** enthalten als einzige Gattung die Stechpalmen (*Ilex*) mit 400 bis 600 Arten. Einige Arten werden als Zierpflanzen verwendet. Die Gattung ist in allen Klimazonen zu finden, vor allem in den Tropen und Subtropen.

1.6.2.2.6.3. Ordnung Asterales (Asterartige)

Die Asterales beinhalten elf Gruppen mit mehr krautigen als verholzenden Pflanzen.

Die **Asteraceae (Korbblütengewächse oder Asterngewächse)** sind aufgrund von phylogenetischen Untersuchungen in zwölf Unterfamilien gegliedert. Die Familie

enthält 1528 Gattungen mit 22750 Arten, die weltweit in allen Klimazonen verbreitet sind. Wegen ihrer ätherischen Öle werden einige Arten als Heil- und Gewürzpflanzen und einige als Nahrungspflanzen oder auch als Zierpflanzen benutzt.

Die **Menyanthaceae (Fieberkleegewächse)** haben fünf Gattungen mit 40 bis 60 Arten, sie sind weltweit verbreitet. Einige Arten (z.B. *Menyanthes trifoliata*) werden als Heilpflanzen benutzt.

1.6.2.2.6.4. Ordnung Dipsacales (Kardenartige)

Die Ordnung enthält nach Bresinsky et al. (2008) sieben Familien (Adoxaceae, Caprifoliaceae, Diervillaceae, Dipsacaceae, Linnaeaceae, Morinaceae, Valerianaceae), nach AGP III (2009) sind fünf davon in die Caprifoliaceae eingegliedert, so dass nur noch zwei Familien (Adoxaceae, Caprifoliaceae) auftreten. Die Dipsacales ist die Schwestergruppe der Paracryphiales. Die Arten sind krautige oder verholzende Pflanzen.

Die **Caprifoliaceae (Geißblattgewächse)** sind meist Sträucher und selten kleine Bäume in fünf Gattungen mit 190 bis 210 Arten.

Die **Dipsacaceae (Kardengewächse)** enthalten 11 Gattungen mit 300 Arten, sie sind in der gesamten Welt verbreitet. Es sind meist krautige Pflanzen, selten auch Halbsträucher. Diese Familie wird in Bresinsky et al. (2008) als eigene Familie behandelt, jedoch nach APG III (2009) den Caprifoliaceae zugeordnet.

1.7. Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse von phenolischen Naturstoffen.

Einerseits sollte überprüft werden, ob *in vitro*-Kulturen von Zingiberaceae (*Curcuma*, *Zingiber*) die typischen Inhaltsstoffe wie Curcuminoide und Gingerole produzieren und akkumulieren.

In einem weiteren Projekt sollten möglichst viele über das gesamte Pflanzenreich verbreitete Pflanzenarten auf das Vorkommen von Rosmarinsäure, Chlorogensäure und (teilweise) Rutin untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Geräte

2.1.1. Versuchsorganismen

Pflanzenarten mehrerer Familien und verschiedener Ordnungen (ca. 220 Pflanzenarten) wurden aus folgenden botanischen Gärten gesammelt:

Botanischer Garten der Justus-Liebig-Universität Gießen

Botanischer Garten der Christian-Albrechts-Universität Kiel

Botanischer Garten der Philipps-Universität Marburg

Da sich das Arbeitsthema in zwei Themenbereiche unterteilte, sind die Versuchsorganismen dementsprechend in zwei Gruppen aufgeteilt:

1. Analyse von phenolischen Naturstoffen in *in vitro*-Kulturen von Zingiberaceae:

Für die Versuche wurden Kalluskulturen von *Zingiber officinale*, *Curcuma longa* und *Curcuma xanthorrhiza* verwendet.

2. Vorkommen von Rosmarinsäure, Chlorogensäure und Rutin im Pflanzenreich:

Für die Versuche wurden hier Blätter von ca. 217 Pflanzen, die zu den folgenden Ordnungen gehören, verwendet:

Alismatales, Apiales, Asterales, Athyales, Boraginales, Celastrales, Cornales, Cucurbitales, Dipsacales, Gentianales, Lamiales, Liliales, Malvales, Myrtales, Poales, Rosales, Solanales, Zingiberales.

2.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die Chemikalien wurden in den Qualitäten p.A. oder reinst verwendet.

Aceton	Riedel-de Haen
Acetonitril	Roth, Karlsruhe
Adeninsulfat	Roth, Karlsruhe
Ameisensäure	Roth, Karlsruhe
Ammoniaklösung	Roth, Karlsruhe
n-Butanol	Roth, Karlsruhe
Cefotaxim	Fresenius, Bad Homburg

Chlor-Schnelldesinfektion	Wülfig & Hauck, Kaufungen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Chlorogensäure	Roth, Karlsruhe
Coniferylalkohol	Fluka, Buchs
Curcumin	Laborsammlung
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Essigsäureanhydrid	Roth, Karlsruhe
Essigsäureethylester	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Gingerole	Phytoflan, Heidelberg
n-Hexan	Roth, Karlsruhe
Macrogol 4 (Polyethylenglykol 400)	Roth, Karlsruhe
Malzextrakt	Roth, Karlsruhe
Methanol	Riedel-de Haen, Seelze
Methyljasmonat	Serva, Heidelberg
Naturstoffreagenz A	Roth, Karlsruhe
ortho-Phosphorsäure 85%	Riedel-de Haen, Seelze
n-Propanol	Roth, Karlsruhe
Rosmarinsäure	Im Institut isoliert aus <i>Melissa officinalis</i>
Rutin	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Toluol	Roth, Karlsruhe

Verbrauchsmaterial

Kieselgel 60 F ₂₅₄ - Platten, 20 x 20 cm, 0,2 mm Schichtdicke	Merck, Darmstadt
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen

2.1.3. Komponenten für Nährmedien

Die folgenden Medienkomponenten wurden von der Firma Duchefa, Haarlem, Niederlande bezogen:

Nicotinsäure

Thiamindichlorid

Pyridoxin x HCl

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)

Benzylaminopurin (BAP)

Naphthylessigsäure (NAA)

Kinetin

Indol-3-Essigsäure (IAA, IES)

KNO₃

FeNaEDTA

Glycin

KH₂PO₄

MgSO₄ x 7 H₂O

NaH₂PO₄

KJ

MnSO₄ x H₂O

ZnSO₄ x 7 H₂O

Mannit

Hefeextrakt (yeast extract)

Weitere Medienkomponenten und ihre Bezugsquellen:

Agar-Agar

Roeper, Hamburg

myo-Inositol

Serva, Heidelberg

NZ-Amine

Otto Aldag, Hamburg

Saccharose

Nordzucker, Braunschweig

CaCl₂ x 2 H₂O

Merck, Darmstadt

(NH₄)₂SO₄

Roth, Karlsruhe

FeSO₄ x 7 H₂O

Fluka, Buchs, Schweiz

Na₂ x EDTA

H₃BO₃

Na₂MoO₄ x 2 H₂O

CuSO₄ x 5 H₂O

CoCl₂ x 6 H₂O

Serva, Heidelberg

Roth, Karlsruhe

Fluka, Buchs, Schweiz

Fluka, Buchs, Schweiz

Merck, Darmstadt

2.1.4. Geräte

Gefriertrockner

Christ L- 1

B. Braun Biotech International,
Melsungen

Drehschieber- Vakuumpumpe RZ 2

Vacuubrand, Wertheim

HPLC

HPLC Pumpe: constaMetric 3200

Detektor: spectroMonitor 3100x

Integrator: Chromato-Integrator D-2500

LDC Analytical, Riviera Beach, USA

LDC Analytical, Riviera Beach, USA

Merck-Hitachi

pH-Meter

Accumet Basic

Fisher Scientific

Photometer

Kontron Uvikon Spektrophotometer 930

Kontron Instruments, Eching

Rotationsverdampfer

Rotavapor RE 120

Membranpumpe MZ 2C

Büchi, Flawil, Schweiz

Vacuubrand, Wertheim

Trockenschrank

Willi Fischer KG, Frankfurt am Main

Ultraschallbad

Sonorex Super RK 255

Bandelin, Berlin

Waagen

Feinwaage Mettler H 64
Digitalwaage PT 310
Digitalwaage EG-300-3M

Mettler, Gießen
Sartorius, Göttingen
Kern, Albstadt

Wasserbad

Julabo 5A

Julabo, Seelbach

Zentrifugen

Biofuge 17 RS
Eppendorf Centrifuge 5415 D
Sigma 3 K 30

Heraeus Sepatech, Düsseldorf
Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
B. Braun Biotech International,
Melsungen

Sorvall RC 50 Plus

Sorvall, Bad Homburg v. d. H.

2.2. Nährmedien für Pflanzenzellkulturen

2.2.1. Stammlösungen für CB-Medien

Makroelemente

Es werden sechs jeweils 100-fach konzentrierte Stammlösungen (Lösungen (1) bis (6)) angesetzt:

<u>Substanz</u>	<u>Menge pro 1 l</u>
(1) KNO_3	250,00 g
(2) $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	25,00 g
(2) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	17,20 g
(4) $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	15,00 g
(5) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	13,40 g
(6) $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	2,56 g
$\text{Na}_2 \times \text{EDTA}$	3,43 g

Diese beiden Komponenten werden zusammen in 1 l Wasser gelöst und die Lösung autoklaviert.

Mikroelemente

Für die Mikroelemente wird eine gemeinsame 100-fach konzentrierte Stammlösung angesetzt:

<u>Substanz</u>	<u>Menge pro 1 l</u>
H ₃ BO ₃	300 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	300 mg
MnSO ₄ x H ₂ O	100 mg
KJ	75 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	25 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	25 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	25 mg

Vitamine

Die drei Vitamine werden in einer 1000-fach konzentrierten Stammlösung angesetzt und portionsweise (1 ml, 2 ml) bei -18 °C gelagert

<u>Substanz</u>	<u>Menge pro 100 ml</u>
Thiamindichlorid	1000 mg
Pyridoxin x HCl	100 mg
Nicotinsäure	100 mg

Hormone

a) 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)

Die Stammlösung ist 100-fach konzentriert und enthält 200 mg 2,4-D in 1 l.

Die Substanz wird in ca. 1 ml unvergältem reinem Ethanol vorgelöst und dann schnell zu 800 ml aqua dest. (auf einem Magnetprüher rührend) zugegeben. Die klare Lösung wird auf das Endvolumen aufgefüllt und portionsweise (10 ml, 20 ml) bei -18 °C eingefroren.

b) Naphthylessigsäure (NAA)

Die Stammlösung ist 100-fach konzentriert und enthält 50 mg NAA in 1 l.

Die Substanz wird in ca. 1 ml unvergältem reinem Ethanol vorgelöst und dann schnell zu 800 ml aqua dest. (auf einem Magnetprüher rührend) zugegeben. Die klare

Lösung wird auf das Endvolumen aufgefüllt und portionsweise (10 ml, 20 ml) bei -18 °C eingefroren.

c) Indol-3-Essigsäure (IES)

Die Stammlösung ist 100-fach konzentriert und enthält 50 mg IES in 1 l.

Die Substanz wird in ca. 1 ml unvergältem reinem Ethanol vorgelöst und dann schnell zu 800 ml aqua dest. (auf einem Magnetrührer rührend) zugegeben. Die klare Lösung wird auf das Endvolumen aufgefüllt und portionsweise (10 ml, 20 ml) bei -18 °C eingefroren.

d) 6-Furfurylaminopurin = Kinetin

Die Stammlösung ist 100-fach konzentriert und enthält 20 mg Kinetin in 1 l.

Die Substanz wird in ca. 1 ml warmer 0,5 M HCl vorgelöst und dann schnell zu 800 ml aqua dest. (auf einem Magnetrührer rührend) zugegeben. Die klare Lösung wird auf das Endvolumen aufgefüllt und portionsweise (10 ml, 20 ml) bei -18 °C eingefroren.

e) Benzylaminopurin (BAP)

Die Stammlösung ist 100-fach konzentriert und enthält 200 mg BAP in 1 l.

Die Substanz wird in ca. 1 ml warmer 0,5 M HCl vorgelöst und dann schnell zu 800 ml aqua dest. (auf einem Magnetrührer rührend) zugegeben. Die klare Lösung wird auf das Endvolumen aufgefüllt und portionsweise (10 ml, 20 ml) bei -18 °C eingefroren.

2.2.2. CB-Medien (nach Petersen und Alfermann, 1988)

1 Liter des CB2-Mediums enthält:

- je 10 ml CB-Makroelemente (6 Stammlösungen)
- 10 ml CB-Mikroelemente (1 Stammlösung)
- CB-Hormone (Stammlösungen siehe 2.4.1) 10 ml IES
10 ml 2,4-D
10 ml NAA
10 ml Kinetin
- 1 ml CB-Vitamine (Stammlösung siehe 2.4.1)

- 100 mg myo-Inositol
- 2 g NZ-Amine
- 20 g Saccharose
- Aqua dest.
- Für Kalluskulturen: 0,8% Agar

Der pH-Wert des Mediums wird mit 0,5 M KOH oder 0,5 M HCl auf pH 5,5 eingestellt. Für Kalluskulturen wurde das Medium in Portionen à 200 ml in passenden Erlenmeyerkolben autoklaviert und dann in Petrischalen gegossen.

Für Suspensionskulturen wurde das Medium (ohne Agar) in Portionen à 50 ml in 250 ml Erlenmeyerkolben autoklaviert.

CB4-Medium entspricht dem CB2-Medium, enthält jedoch 40 g/l Saccharose.

CB2OH-Medium entspricht dem CB2-Medium, jedoch wurden die Hormone weggelassen.

2.2.3. B5-Medium (nach Gamborg et al., 1968)

1 Liter des B5-Mediums enthält:

- je 10 ml CB-Makroelemente (6 Stammlösungen)
- 10 ml CB-Mikroelemente (1 Stammlösung)
- Hormone: 1 mg 2,4-D (2 ml einer 0,5 mg/ml Stammlösung)
0,1 mg Kinetin (0,5 ml einer 0,2 mg/ml-Stammlösung)
- 1 ml CB-Vitamine (Stammlösung siehe 2.4.1)
- 100 mg myo-Inositol
- 2 g NZ-Amine
- 20 g Saccharose
- Aqua dest.
- Für Kalluskulturen: 1% Agar

Der pH-Wert des Mediums wird mit 0,5 M KOH oder 0,5 M HCl auf pH 5,8 eingestellt.

2.2.4. Stammlösungen für MS-Medien (nach Murashige und Skoog, 1962)

Makroelemente

Für die Makroelemente wird eine gemeinsame 25-fach konzentrierte Stammlösung angesetzt.

<u>Substanz</u>	<u>Menge pro 1 l</u>
KNO ₃	47,50 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	9,25 g
KH ₂ PO ₄ x H ₂ O	4,25 g
CaCl ₂ x H ₂ O	11,00 g
NH ₄ NO ₃	41,25 g

Die Komponenten werden zusammen in 1 l Wasser gelöst und die Lösung autoklaviert.

Mikroelemente

Für die Mikroelemente wird eine gemeinsame 100-fach konzentrierte Stammlösung angesetzt:

<u>Substanz</u>	<u>Menge pro 1 l</u>
H ₃ BO ₃	620,00 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	860,00 mg
MnSO ₄ x H ₂ O	1690,00 mg
KJ	83,00 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	25,00 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	2,50 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	2,50 mg
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2,78 mg
Na ₂ x EDTA	3,73 mg

Vitamine

Die drei Vitamine werden in einer 1000-fach konzentrierten Stammlösung angesetzt. Hiervon wird 1 ml zu 1 l Medium zugegeben.

<u>Substanz</u>	<u>Menge pro 100 ml</u>
Thiamindichlorid	1000 mg
Pyridoxin x HCl	100 mg
Nicotinsäure	100 mg

2.2.5. MS-Medium

1 Liter des MS-Mediums enthält:

- 40 ml MS-Makroelemente
- 10 ml MS-Mikroelemente
- MS-Hormone 3,0 mg BAP
 0,5 mg NAA
- 1 ml MS-Vitamine (Stammlösung siehe 2.4.4)
- 100 mg myo-Inositol
- 30 g Saccharose
- Aqua dest.
- Für Kalluskulturen: 0,8% Agar

Der pH-Wert des Mediums wird mit 0,5 M KOH oder 0,5 M HCl auf pH 5,8 eingestellt. Für Kalluskulturen wurde das Medium in Portionen à 200 ml in passenden Erlenmeyerkolben autoklaviert und dann in Petrischalen gegossen.

2.2.6. MS-Li-Medium

1 Liter des MS-Li-Mediums enthält:

- 40 ml MS-Makroelemente
- 10 ml MS-Mikroelemente
- MS-Hormone: 0,01 mg/l NAA (2 ml einer 0,2 mg/ml Stammlösung)
- 1 ml Glycin (200mg/100ml)
- 1 ml MS-Vitamine (Stammlösung siehe 2.4.4)
- 100 mg myo-Inositol
- 30 g Saccharose
- Aqua dest.

Der pH-Wert des Mediums wird mit 0,5 M KOH oder 0,5 M HCl auf pH 5,8 eingestellt.

2.2.7. Weitere Abwandlungen des MS-Mediums

1 Liter des Mediums enthält:

- 40 ml MS-Makroelemente
- 10 ml MS-Mikroelemente
- MS-Hormone: Es wurden verschieden MS-Medien mit unterschiedlichen Hormonkombinationen und -konzentrationen angesetzt.

<u>Substanz</u>	<u>Menge pro 1 l</u>
BAP	0,5 mg
NAA	5 mg

<u>Substanz</u>	<u>Menge pro 1 l</u>
Kinetin	0,2 mg
2,4 D	1 mg

<u>Substanz</u>	<u>Menge pro 1 l</u>
Kinetin	0,3 mg
NAA	0,45 mg

- 1 ml MS-Vitamine (Stammlösung siehe 2.4.4)
- 100 mg myo-Inositol
- 25 g Saccharose
- Aqua dest.
- Für Kalluskulturen: 0,8% Agar

Der pH-Wert des Mediums wird mit 0,5 M KOH oder 0,5 M HCl auf pH 5,8 eingestellt. Für Kalluskulturen wurde das Medium in Portionen à 200 ml in passenden Erlenmeyerkolben autoklaviert und dann in Petrischalen gegossen.

2.2.8. Medium nach Schenk & Hildebrandt (1972)

Stammlösungen für Schenk & Hildebrandt Medien

Makroelemente

Für die Makroelemente wird eine gemeinsame 40-fach konzentrierte Stammlösung angesetzt:

<u>Substanz</u>	<u>Menge pro 1 l</u>
KNO ₃	50 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3901 mg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	3020 mg
(NH ₄)H ₂ PO ₄	600 mg

Diese Komponenten werden zusammen in 1 l Wasser gelöst und die Lösung autoklaviert.

Mikroelemente

Für die Mikroelemente wird eine gemeinsame 100-fach konzentrierte Stammlösung angesetzt:

<u>Substanz</u>	<u>Menge pro 1 l</u>
H ₃ BO ₃	250 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	50 mg
MnSO ₄ x H ₂ O	500 mg
KJ	50 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	5 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	10 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	5 mg
FeNa EDTA	990 mg

Vitamine

Die drei Vitamine werden in einer 1000-fach konzentrierten Stammlösung angesetzt. Davon wird 1 ml zu 1 l Medium zugegeben.

<u>Substanz</u>	<u>Menge pro 100 ml</u>
Thiamindichlorid	500 mg
Pyridoxin x HCl	50 mg
Nicotinsäure	500 mg

2.2.9. Medium nach Schenk & Hildebrandt (SHB)

1 Liter des SHB-Mediums enthält:

- 25 ml SHB-Makroelemente
- 10 ml SHB-Mikroelemente
- SHB-Hormone:

Die Hormone wurden in verschiedenen Kombinationen angesetzt und zugegeben:

<u>Substanz</u>	<u>Menge pro 1 l</u>
2,4-D	0,5 mg
CPA	1,0 mg
Kinetin	1 mg

<u>Substanz</u>	<u>Menge pro 1 l</u>
Adeninsulfat	10 mg
BAP	0,25 mg
Indol-3-Essigsäure (IES)	0,5 mg
Malzextrakt	100 mg

<u>Substanz</u>	<u>Menge pro 1 l</u>
Adeninsulfat	15 mg
BAP	0,25 mg
IES	2,5 mg
Malzextrakt	200 mg

- 1 ml SHB-Vitamine
- 100 mg myo-Inositol
- 30 g Saccharose
- Aqua dest.
- Für Kalluskulturen: 0,8% Agar

Der pH-Wert des Mediums wird mit 0,5 M KOH oder 0,5 M HCl auf pH 5,8 eingestellt. Für Kalluskulturen wurde das Medium in Portionen à 200 ml in passenden Erlenmeyerkolben autoklaviert und dann in Petrischalen gegossen.

2.3. Medien zur Kultivierung von Bakterien

2.3.1. *Agrobacterium rhizogenes*

Die folgenden Stämme von *Agrobacterium rhizogenes* wurden verwendet:

TR105

LBA9402

LBA15843

2.3.2. YMB Medium (yeast mannitol broth)

1 Liter des YMB-Mediums enthält:

<u>Substanz</u>	<u>Menge pro 1 l</u>
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Mannit	10,0 g
Hefeextrakt	0,5 g

Der pH-Wert des Mediums wird mit 0,5 M KOH auf pH 7,0 eingestellt.

2.4. Pflanzliche *in vitro*-Kulturen

2.4.1. Anlegen von Kalluskulturen

Das Pflanzenmaterial zum Anlegen der Kalluskulturen wurde von der Institutsgärtnerei zur Verfügung gestellt. Ingwerrhizome wurden darüber hinaus aus örtlichen Lebensmittelgeschäften bezogen.

Von *Zingiber officinale*, *Curcuma longa* und *Curcuma xanthorrhiza* (alle Zingiberaceae) wurden Kalluskulturen aus Blättern und Rhizomen angelegt. Weitere Pflanzen waren *Collinsonia canadensis* (Sprosse) und *Maranta leuconeura* (Sprosse und Blätter).

Das Pflanzenmaterial wurde für zwei Minuten in 70% Ethanol gelegt und anschließend je nach Pflanzenorgan (Rhizom 20 Minuten, Blätter 10 Minuten) in einer 5% Chlorlösung desinfiziert. Danach wurden die Pflanzenorgane dreimal mit sterilisiertem destilliertem Wasser gewaschen.

Die Pflanzenorgane wurden steril geschält und in dünne Stücke geschnitten, dann wurden sie auf verschiedene Nährmedien (siehe 2.4) in Petrischalen zur Kallusbildung ausgelegt. Die Agarplatten wurden bei 25 °C im Dunkeln und im Tageslicht inkubiert.

Nach Auftreten der ersten Kalluszellen (nach ca. 9 Wochen) bzw. Wurzeln (bei *Zingiber officinale*) wurden diese auf frisches Nährmedium überführt und anschließend regelmäßig (alle 1-2 Wochen) überimpft.

2.4.2. Anlegen von Kalluskulturen aus Rhizomknospen

Die Rhizome wurden im Gewächshaus bei 25-30°C in Erde unter einer Beleuchtung von 400 W kultiviert. Nach zwei Wochen neu ausgetriebene Knospen wurden zur Anlage von Kalluskulturen auf MS- und SHB-Medium verwendet (Zarate und Yeoman, 1996).

2.4.3. Anlegen von Suspensionskulturen

Suspensionskulturen wurden aus Kallus- und Wurzelkulturen von *Curcuma xanthorrhiza* und *Zingiber officinale* in flüssigem SHB-, B5-, CB2- und CB4-Medium angelegt. Hierzu wurden je 5 g Zellmaterial in 50 ml flüssiges Nährmedium in 250 ml-Erlenmeierkolben übertragen und im Dunkeln bei 25 °C auf einem Schüttler mit 110 UpM inkubiert. Die Suspensionen wurden regelmäßig wöchentlich überimpft. Hierzu wurden 5 g Zellmaterial mit einem perforierten Metalllöffel in frisches Nährmedium (50 ml) übertragen.

2.4.4. Elicitierung von Suspensionskulturen

Suspensionskulturen von *Curcuma xanthorrhiza* in SHB-Medium und von *Zingiber officinale* in B5-Medium wurden für Elicitierungsversuche vermehrt. Am 3. Kulturtag wurden in je zwei Kolben steril 50 µl 100 mM Methyljasmonat (Endkonzentration 100

µM) in Ethanol bzw. als Kontrolle 50 µl Ethanol (beide Flüssigkeiten sterilfiltriert) zugesetzt. Ein Kolben wurde am Zugabetag direkt geerntet.

3 und 4 Tage nach Zugabe wurden je ein Methyljasmonat-behandelter und ein Kontrollkolben geerntet. Hierzu wurden die Zellen mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe auf einem Büchnertrichter mit Papierfilter abgesaugt. Es wurden jeweils zweimal 2 g Zellen eingewogen und im Trockenschrank bei 80 °C für 3-4 Stunden getrocknet bzw. eingefroren und 24 Stunden lyophilisiert. Anschließend wurden die Zellen getrennt gemörsert und wie in 2.5.1.3. beschrieben extrahiert und analysiert.

Der Versuch wurde nach acht Wochen wiederholt.

2.4.5. Anlage von Hairy Root-Kulturen

Hairy Roots sind als Wurzeln wachsende Kulturen, bei denen *Agrobacterium rhizogenes* Teile seines R_i-Plasmids in Pflanzenzellen überträgt und die übertragene DNA stabil ins Genom integriert wird. Durch Änderung des Hormonstoffwechsels bzw. der Hormonsensitivität wachsen die transformierten Zellen stabil als Wurzeln.

2.4.5.1 Anzucht der *Agrobacterium rhizogenes*-Stämme LBA9402, LBA15834 und TR105

Aus Dauerkulturen wurden je 20 ml steriles YMB-Medium mit Bakterien angeimpft und drei Tage im Dunkeln auf dem Schüttler bei 110 UpM und 26 °C kultiviert.

2.4.5.2. Etablierung der Hairy Root-Kulturen

Als Pflanzenmaterial wurden Rhizome, Blätter und Kalluskulturen von *Zingiber officinale* und *Curcuma xanthorrhiza* verwendet.

Das Pflanzenmaterial wurde wie in 2.4.1. beschrieben sterilisiert (außer Kalluskulturen) und in je drei Petrischalen mit verschiedenen Mengen der Bakteriensuspension (10, 15, 20 µl) der drei *Agrobacterium rhizogenes*-Stämme LBA9402, LBA15834, TR105 für drei Tage co-kultiviert.

Nach drei Tagen wurde das Pflanzenmaterial zweimal mit Cefotaxim-Lösung (20 µl einer sterilfiltrierten Cefotaxim-Stammlösung (2 g/40 ml) in 20 ml sterilem Wasser) gewaschen, dann auf sterilen Papierstücken abgetrocknet und anschließend auf

hormonfreien Agarmedien (CB2, SHB, MS) mit Cefotaxim (Stammlösung 1:100 verdünnt; nach dem Abkühlen der verflüssigten Agarmedien zugegeben) ausgelegt. Diese Waschschrte wurden für die ersten 10 Tage alle 2 Tage wiederholt, dann zweimal wöchentlich, bis die Kulturen keine Bakterien mehr enthielten.

2.5. Extraktion und Nachweis von Gingerolen und Curcuminoiden

2.5.1. Extraktion von Rhizomen und *in vitro*-Kulturen

2.5.1.1. Extraktion von frischem Pflanzenmaterial

Rhizome von *Zingiber officinale*, *Curcuma longa* und *Curcuma xanthorrhiza* wurden aus der Gärtnerei unseres Instituts bzw. aus lokalen Supermärkten (Ingwer) bezogen.

Die Rhizome wurden gut in Leitungswasser gewaschen und geschält. 5 g der frischen Rhizome wurden eingewogen und gemörkert und anschließend verschiedenen Extraktionsmethoden unterworfen:

- 5 g gemörkertes Rhizom wurde mit 10 ml Ethanol p.a. für 20 Minuten im Ultraschallbad für 20 min extrahiert. Der Extrakt wurde nach Zentrifugation (4000 g, 10 Minuten) abpipettiert und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml Methanol p.a. rückgelöst.
- 5 g gemörkertes Rhizom wurde mit 50 bzw. 100 ml Methanol p.a. für eine Stunde rühren gelassen, abfiltriert, am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingedampft und anschließend mit 1 ml Methanol p.a. aufgenommen.
- 5 g gemörkertes Rhizom wurde mit 50 ml Ethanol p.a. für eine Stunde rühren gelassen, abfiltriert, am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingedampft und anschließend mit 1 ml Methanol p.a. aufgenommen.
- 5 g gemörkertes Rhizom wurde mit 50 ml Aceton p.a. für eine Stunde rühren gelassen, abfiltriert, am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingedampft und anschließend mit 1 ml Methanol p.a. aufgenommen.
- 5 g gemörkertes Rhizom wurde mit 50 ml Petrolether p.a. für eine Stunde rühren gelassen, abfiltriert, am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingedampft und anschließend mit 1 ml Methanol p.a. aufgenommen.

2.5.1.2. Extraktion von getrocknetem Pflanzenmaterial

Rhizome von *Zingiber officinale* und *Curcuma xanthorrhiza* wurden auf zwei verschiedene Weisen getrocknet:

- Rhizome wurden für 24 Stunden bei -20 °C eingefroren, dann für 48 Stunden in einem Gefriertrockner lyophilisiert. Danach wurden die getrockneten Rhizome gewogen zur Bestimmung des Trockengewichts.
- Rhizome wurden im Trockenschrank bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Vom Trockenmaterial wurde jeweils 1 g eingewogen und mit 50 ml Ethanol p.a., Methanol p.a., Aceton p.a. oder Petrolether p.a. eine Stunde rühren gelassen, abfiltriert, eingedampft und anschließend mit 1 ml MeOH aufgenommen.

2.5.1.3. Extraktion von getrockneten Kalluszellen

Kalluszellen wurden von Kulturmedium abgehoben, für 24 Stunden bei -20 °C eingefroren und für 48 Stunden in einem Gefriertrockner lyophilisiert. Danach wurden sie gewogen zur Bestimmung des Trockengewichts.

Alternativ wurden die Kalluszellen im Trockenschrank bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Je 0,5 g Zelltrockenmasse wurden mit 10 ml Ethanol p.a. eine Stunde rühren gelassen und abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockene entfernt und der Rückstand mit 0,5 ml Methanol aufgenommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Methanol wurde im Abzug verdampft.

2.5.2. Analyse der Zingiberaceen-Naturstoffe über HPLC und Dünnschichtchromatografie

2.5.2.1 Referenzlösungen

Gingerole:

Gingerol 6	1 mg/ml in Methanol p.a.
Gingerol 8	1 mg/ml in Methanol p.a.

Diese Lösungen wurden als Standards für die DC verwendet. Als HPLC-Standards wurden die Lösungen 1:10 mit 50% Methanol/0,01% o-Phosphorsäure verdünnt.

Curcuminoide:

Curcumin 10 mg/ml in Methanol p.a.

Diese Lösung wurde als Standard für die DC verwendet. Als HPLC-Standard wurde die Lösung zunächst 1:10 mit Methanol p.a. verdünnt. Eine weitere Verdünnung erfolgte 1:10 mit 50% Methanol/0,01% o-Phosphorsäure.

2.5.2.2. Optimierung die Analyse von Curcuminoiden und Gingerolen über HPLC

Curcuminoide

Extrakte aus Rhizomen und Kalluszellen von *Curcuma*-Arten wurden zunächst 1:10 mit Methanol p.a. verdünnt. Eine weitere Verdünnung erfolgte 1:10 mit 50% Methanol/0,01% o-Phosphorsäure bei Rhizomextrakten.

Die HPLC-Analyse erfolgte über eine Hypersil ODS-Säule (250 mm x 4 mm; Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule (20 mm x 4 mm). Die Flussrate betrug 2 ml/min. Die Detektion erfolgte bei 428 nm.

Zur Optimierung der Trennbedingungen wurden verschiedene Laufmittel ausprobiert:

- (1) 35% Acetonitril / 65% Wasser / 0,01% o-Phosphorsäure
- (2) 40% Acetonitril / 60% Wasser / 0,01% o-Phosphorsäure
- (3) 50% Acetonitril / 50% Wasser / 0,01% o-Phosphorsäure
- (4) 40% Acetonitril / 23% Methanol / 36% Wasser / 1% Essigsäure

Laufmittel (1) ergab die besten Trennungen und wurde für Routineanalysen verwendet.

Gingerole

Extrakte aus Rhizomen und Kalluszellen von *Zingiber officinale* wurden 1:10 mit Methanol p.a. verdünnt.

Die HPLC-Analyse erfolgte über eine Hypersil ODS-Säule (250 mm x 4 mm; Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule (20 mm x 4 mm). Die Flussrate betrug 1,3 ml/min. Die Detektion erfolgte bei 280 nm.

Zur Optimierung der Trennbedingungen wurden verschiedene Laufmittel ausprobiert:

(1) 43% Acetonitril / 5% Methanol / 52% Wasser

(2) 70% Methanol / 30% Essigsäure (0,1%)

Mit beiden Laufmitteln ergaben sich gute Trennungen.

2.5.2.3. Optimierung die Analyse von Curcuminoiden und Gingerolen über DC

Curcuminoide

Unverdünnte Extrakte (20 µl) aus frischem und getrocknetem Pflanzenmaterial (*Curcuma longa*, *Curcuma xanthorrhiza*) wurden auf Kieselgelplatten F₂₄₅, 0,2 mm Schichtdicke aufgetragen. Das Auftragvolumen des Curcumin-Standards (10 mg/ml) betrug 20 µl. Als Fließmittel wurde Chloroform:Essigsäure 9:1 verwendet. Zur Detektion wurden die getrockneten Platten mit Essigsäureanhydrid:Schwefelsäure (9:1) besprüht. Im Tageslicht erschienen die Curcuminoide als rotbraune Flecken. Im UV-Licht (312 nm) fluoreszierten die Curcuminoide als gelbe Flecken.

Gingerole

Unverdünnte Extrakte von frischem oder trockenem Pflanzenmaterial (*Zingiber officinale*) wurden auf Kieselgelplatten F₂₄₅, 0,2 mm Schichtdicke aufgetragen. Das Auftragvolumen der Gingerol-Standards (1 mg/ml) betrug 20 µl.

Verschiedene mobile Phasen wurden ausprobiert:

(1) Toluol:Ethylacetat 8:2

(2) n-Hexan:Aceton 8:2

(3) n-Hexan:Diethylether 4:6

(4) Toluol:Ethylacetat 9,3:0,7

Laufmittel (1) brachte die besten Ergebnisse.

Nach dem Lauf wurden die Platten getrocknet und anschließend zuerst mit 2,5 ml Schwefelsäure in 50 ml Ethanol p.a., anschließend mit Vanillin-Reagenz (0,5 mg Vanillin in 50 ml Ethanol p.a.) besprüht. Danach wurden die Platten bei 80 °C im Trockenschrank entwickelt. Gingerole erscheinen im Tageslicht als rote Flecken.

2.6. Extraktion und Nachweis von Rosmarinsäure, Chlorogensäure und Rutin

2.6.1 Pflanzenmaterial

Ausgewachsene Blätter von über 200 Pflanzenarten wurden gesammelt, gefriergetrocknet, extrahiert und mit HPLC und Dünnschichtchromatografie auf ihre Gehalte von Rosmarinsäure (RA), Chlorogensäure (CA) und Rutin (nur bei Arten aus der Ordnung Zingiberales) untersucht.

Die Pflanzen wurden aus drei verschiedenen Botanischen Gärten gesammelt:

Botanischer Garten der Justus-Liebig-Universität Gießen

Botanischer Garten der Christian-Albrechts-Universität Kiel

Botanischer Garten der Philipps-Universität Marburg

2.6.2 Extraktion

Die Blätter wurden für 24 Stunden bei -20 °C eingefroren und anschließend für 48 Stunden im Gefriertrockner lyophilisiert. Die trockenen Blätter wurden gemörsert und in Doppelproben à 50 mg in Plastikzentrifugenröhrchen eingewogen. Anschließend wurden 2 ml 70% Ethanol zugegeben, die Röhrchen locker verschlossen und zweimal für je 10 min bei 70 °C im Ultraschallbad behandelt. Vor und nach der Extraktion sowie nach 10 Minuten Ultraschallbehandlung wurden die Proben kräftig geschüttelt. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert und der klare Überstand abgenommen. Die Extrakte wurden bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

2.6.3. HPLC-Analyse von RA, CA und Rutin

Die Pflanzenextrakte wurden zur Analyse von RA, CA und Rutin in der Regel 1:10 mit dem jeweiligen Laufmittel verdünnt. Im Falle kleiner Produktkonzentrationen wurden die Extrakte mit demselben Volumen 0,02% H₃PO₄ versetzt.

Als Trennsäule wurde eine Hypersil ODS-Säule (0,5 µm Partikelgröße, 280 x 4 mm mit 20 x 4 mm Vorsäule) verwendet.

Die Laufmittel waren Gemische aus 35-50% Methanol und 65-50% Wasser, beide angesäuert mit 0,01% H_3PO_4 .

Die Flussrate war 0,8-1 ml/min und die Detektionswellenlänge 333 nm. Das Einspritzvolumen über eine Probenschleife betrug 20 μl .

Als Standards wurden Rosmarinsäure und Chlorogensäure (jeweils 25 μM in 50% Methanol/0,01% H_3PO_4) bzw. Rutin (1,5 mM in 50% Methanol/0,01% H_3PO_4) verwendet. Die Nachweisgrenze für Rosmarinsäure lag unter den angegebenen Analysebedingungen bei 0,01 nmol.

2.6.4. Dünnschichtchromatografische Untersuchung auf RA, CA und Rutin

Zur Verifizierung der Ergebnisse aus den HPLC-Untersuchungen wurden die Pflanzenextrakte zusätzlich über DC analysiert.

2.6.4.1. DC zur Identifizierung von RA und CA

Auf Kieselgel 60 F_{254} -Platten (0,2 mm Schichtdicke) wurden 200 μl der unverdünnten Extrakte und 100 μl 10 mM Rosmarinsäure und 30 μl 10 mM Chlorogensäure aufgetragen. Die Platten wurden im Laufmittel Ethylacetat/Chloroform/Ameisensäure 50:40:10 entwickelt. Die Detektion erfolgte zunächst im UV-Licht bei 254 nm, wo Substanzen durch ihre Fluoreszenzlöschung erkannt werden können, bzw. bei 312 nm, wo Kaffeesäurederivate blau fluoreszieren. Anschließend wurden die Platten mit Naturstoffreagenz A (0,6 g/100 ml Methanol) und 5% Polyethylenglycol 400 in Methanol besprüht und im UV-Licht bei 254 und 312 nm betrachtet (Kumaran und Karunakaran, 2007). Rosmarinsäure erschien als gelber Fleck bei einem R_f -Wert von $\approx 0,7$, Chlorogensäure als hellblauer Fleck bei einem R_f -Wert von $\approx 0,14$.

Als weitere Laufmittelgemische wurden ausprobiert:

- Toluol/n-Propanol/Essigsäure/Wasser 15:18:10:5
- Xylol/Ethylacetat/70% EtOH/MeOH 21:21:6:3,6
- Ethylacetat/Wasser/Ameisensäure 8:1:1

Weitere Detektionsreagenzien waren:

- Ammoniakdampf

- Methanol/Schwefelsäure: 10 ml konzentrierte Schwefelsäure mit 90 ml Methanol unter Eiskühlung mischen, die Platten besprühen, im Trockenschrank bei 95-140 °C erhitzen und anschließend unter UV Licht betrachten.

2.6.4.2. DC zur Identifizierung von Rutin

Auf Kieselgel 60 F₂₅₄-Platten (0,2 mm Schichtdicke) wurden 200 µl der unverdünnten Extrakte und 100 µl Standardlösung Rutin (10 mg/ml) aufgetragen. Die Platten wurden im Laufmittel Ethylacetat/Wasser/Ameisensäure 32,5:10:7,5 entwickelt. Die Detektion erfolgte im sichtbaren Licht oder nach Besprühen mit Naturstoffreagenz A (0,6 g/100 ml Methanol). Rutin erschien als gelber Fleck bei einem R_f-Wert von \approx 0,46.

Mit Celluloseplatten wurden drei weitere Laufmittelsysteme ausprobiert, die jedoch keine zufriedenstellende Auftrennung ergaben:

- Chloroform/Essigsäure/Wasser 25:22,5:2,5 (CAW)
- obere Phase von n-Butanol/Essigsäure/Wasser 4:1:5 (BAW)
- BAW/Wasser/15% Essigsäure/Phenol 45:23:51:46 (Markham, 1982)

2.6.5. ¹H-NMR

Zur eindeutigen Identifizierung von Rosmarinsäure und Rutin in Extrakten aus *Maranta leuconeura* "Fascinator" wurden die Substanzen nach HPLC-Analyse gereinigt und zur ¹H-NMR-Analyse zu Dr. Bernd Schneider, Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena geschickt.

Die in mehreren Injektionen aus der HPLC-Säule eluierenden "Peaks" von RA und Rutin wurden aufgefangen, am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt und in Methanol aufgenommen. Zur weiteren Reinigung wurden sie auf Kieselgel 60 F₂₅₄-Platten aufgetragen und in Ethylacetat/Chloroform/Ameisensäure 50:40:10 entwickelt. Die Banden von RA und Rutin wurden ausgekratzt und je dreimal mit Methanol extrahiert. Die getrockneten Extrakte wurden zur weiteren Analyse verschickt.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Farne

Die Polypodiales sind eine Ordnung der Farnpflanzen, die zu den Gefäßsporenpflanzen (Pteridophyta) gehören.

Rosmarinsäure wurde bereits 1965 zum ersten Mal in den Blechnaceae (*Blechnum brasiliense*) nachgewiesen (Harborne, 1965). In der vorliegenden Arbeit wird bestätigt, dass Rosmarinsäure in manchen Arten der Blechnaceae wie *Blechnum brasiliense* (Abb. 11) und *Blechnum gibbum* (Abb. 12) enthalten ist, wobei in anderen Arten das Vorkommen von Rosmarinsäure nicht bestätigt werden konnte (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Rosmarinsäure- und Chlorogensäure-Konzentrationen in den Blättern von verschiedenen Arten der Blechnaceae; Jahreszahlen beziehen sich auf zwei getrennte Bestimmungen in den angegebenen Jahren. Die Konzentrationen wurden mit HPLC bestimmt und die Identität der Substanzen mit DC bestätigt (M = Marburg, G = Gießen, TG = Trockengewicht, * = Spuren).

Klasse Polypodiopsida / Familie	Art	Her- kunft	Rosmarinsäure		Chlorogensäure	
			% des Blatt-TG		% des Blatt-TG	
			HPLC	DC	HPLC	DC
Polypodiales						
Blechnaceae	<i>Blechnum arcuatum</i> (2006)	M	-	-	1,21 ± 0,06	+
	<i>Blechnum arcuatum</i> (2007)	M	0,045 *		1,63 ± 0,13	
	<i>Blechnum brasiliense</i> (2006)	M	0,40 ± 0,06	+	0,47 ± 0,05	+
	<i>Blechnum brasiliense</i> (2007)	M	0,26 ± 0,04	+	0,75 ± 0,15	+
	<i>Blechnum gibbum</i> (2006)	M	0,43 ± 0,13	+	0,66 ± 0,12	+
	<i>Blechnum gibbum</i> (2007)	M	0,07 ± 0,01	+	0,15 ± 0,01	+
	<i>Blechnum occidentale</i>	M	-	-	5,80 ± 0,30	+
	<i>Blechnum polypodioides</i>	M	-		0,09 ± 0,01	-
	<i>Doodia caudata</i>	G	-		-	

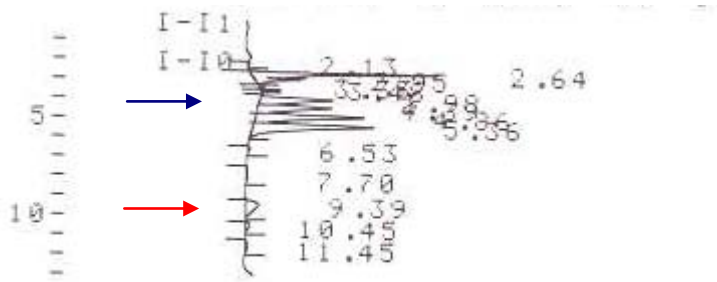


Abb. 11: HPLC-Chromatogramm eines Extrakts aus *Blechnum brasiliense*. Der blaue Pfeil deutet auf den Peak für Chlorogensäure, der rote auf Rosmarinsäure. Retentionszeit von Rosmarinsäure 9,39 und von Chlorogensäure 3,48.

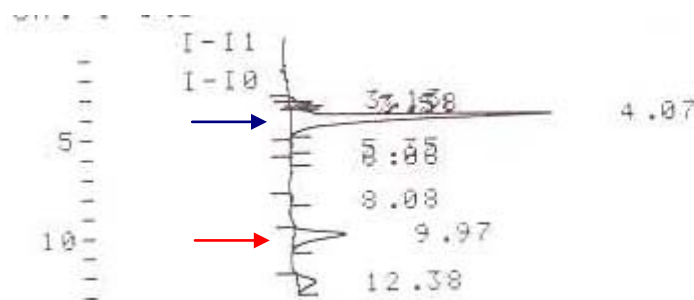


Abb. 12: HPLC-Chromatogramm eines Extrakts aus *Blechnum gibbum*. Der blaue Pfeil deutet auf den Peak für Chlorogensäure, der rote auf Rosmarinsäure. Retentionszeit von Rosmarinsäure 9,97 und von Chlorogensäure 4,07.

Auffällig ist bei den Blechnaceae das Vorkommen von Chlorogensäure in allen Arten von *Blechnum*, die hier untersucht wurden, also *B. arcuatum*, *B. brasiliense*, *B. gibbum*, *B. occidentale* und *B. polypodioides* (siehe Tabelle 3). Dies gilt auch für andere Arten von *Blechnum* wie *B. orientale*, *B. spicant*, *B. discolor*, denn Bohm konnte im Jahr 1968 Chlorogensäure in den Blättern dieser Arten nachweisen. Er konnte aber weder Chlorogensäure noch Rosmarinsäure in *Doodia dives* finden. Dies wird auch durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt, in der weder Rosmarinsäure noch Chlorogensäure in *Doodia caudata* nachweisbar waren.

In einer anderen Studie wurden die polyphenolischen Inhaltsstoffe in *B. orientale* und in anderen Arten von verschiedenen Farnfamilien wie Aspleniaceae, Cytheaceae, Gleicheniaceae und Pteridaceae bestimmt. Dies hat gezeigt, dass *B. orientale* die höchsten Konzentrationen davon produziert, wobei eine der Substanzen Chlorogensäure ist (Lai et al., 2009).

Andererseits wurde in einer Studie im Jahr 1992 festgestellt, dass *Blechnum spicant* keine Chlorogensäure produziert (Veit et al., 1992).

3.2. Monokotyledonen

3.2.1. Ordnung Alismatales

Es ist schon bekannt, dass Rosmarinsäure in manchen Familien der Alismatales vorkommt. Die Substanz wurde in Zosteraceae (Ravn et al., 1994), aber auch in Potamogetonaceae (Petersen und Simmonds, 2003) nachgewiesen.

3.2.1.1. Familie Araceae

In Vertretern der Familie Araceae wurde Rosmarinsäure ebenfalls gefunden, und zwar in den Blättern von *Anthurium versicolor* (Aquino et al., 2001).

In der vorliegenden Studie konnte in *Arum italicum* keine Rosmarinsäure oder Chlorogensäure nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3). El-Desouki et al. (2007) wiesen in *Arum* Flavone nach, die die antioxidative Wirkung von *Arum* verursachen.

3.2.1.2. Familie Juncaginaceae

In *Triglochin striatum* ergab die Untersuchung weder Rosmarinsäure noch Chlorogensäure (siehe Tabelle 3).

3.2.2. Liliales und Poales

Rosmarinsäure wurde schon in der Ordnung Liliales nachgewiesen (Lee et al., 2008). Triterpenoide konnten aus *Chionodoxa luciliae* isoliert werden (Adenolfi et al., 1993). Phenolische Glycoside wurden in einigen Arten der Liliaceae wie z.B. *Lilium auratum* (Shimomura et al., 1987) nachgewiesen, auch in Juncaceae wie z.B. *Juncus effusus* (Dellagrecia et al., 1998). Aus *Juncus effusus* wurden Monoglyceride und Diglyceride isoliert, und aus *Juncus acutus* konnten fünf phenolische Glycoside isoliert werden, u.a. der Kaffeesäure (Awaad, 2006).

In *Juncus effusus* wurden phenolische Stoffe gefunden, und die ungewöhnliche Verbindung 7,8-Dihydroxycoumarin (Daphnetin) wurde identifiziert (Williams und Harborne, 1975). Rosmarinsäure wurde in drei Gattungen der Familie Poaceae (*Dactylis glomerata*, *Festuca rubra*, *Festuca ovina*, *Bromus marginatus*) nachgewiesen (Sterbova et al., 2004). In der vorliegenden Studie wurde von den

Liliaceae nur *Chionodoxa luciliae* untersucht. Dabei konnte weder Rosmarinsäure noch Chlorogensäure nachgewiesen werden. Bei den Juncaceae wurden zwei Arten der Gattung *Juncus* untersucht: *Juncus effusus* und *Juncus subnodulosus*. In beiden konnte keine Rosmarinsäure gefunden werden, wobei aus der zweiten Art Chlorogensäure isoliert werden konnte (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Rosmarinsäure- und Chlorogensäure-Konzentrationen in den Blättern von verschiedenen Arten der Araceae, Juncaginaceae, Liliaceae und Juncaceae. Die Konzentrationen wurden mit HPLC bestimmt und die Identität der Substanzen mit DC bestätigt (TG = Trockengewicht, * = Spuren): Die Angabe einer Masse bedeutet, dass eine größere Masse der pulverisierten Blätter zusätzlich untersucht wurden.

Klasse / Familie	Art	Herkunft	Rosmarinsäure		Chlorogensäure	
			% des Blatt-TG		% des Blatt-TG	
			HPLC	DC	HPLC	DC
Alismatales						
Araceae	<i>Arum italicum</i>	M	-	-	-	-
Juncaginaceae	<i>Triglochin striatum</i>	M	0,05 *		-	
	<i>Triglochin striatum</i> (220 mg)	M	-		-	
Liliales						
Liliaceae	<i>Chionodoxa luciliae</i>	M	-	-	-	-
Poales						
Juncaceae	<i>Juncus effusus</i>	M	0,08 *	-	0,24*	-
	<i>Juncus effusus</i> (200 mg)	M	(+)	-	(+)	-
	<i>Juncus subnodulosus</i>	M	0,015 *	-	1,40 ± 0,12	+

3.2.3. Zingiberales

Im Rahmen der kontinuierlichen Suche nach Pflanzen, die Rosmarinsäure bilden und speichern, konnte erstmals Rosmarinsäure in *Maranta leuconeura* (Abb. 13) nachgewiesen werden (Abdullah et al., 2008). *M. leuconeura* wird als Zierpflanze häufig in Botanischen Gärten in verschiedenen Varietäten kultiviert und ist in vielen Gärtnereien erhältlich. In den drei Varietäten *M. leuconeura* „Fascinator“, „Kerchoviana“ und „Massangeana“ wurde in den Blättern ein Rosmarinsäure-Gehalt von 0,78 bis 0,87 % des Trockengewichts nachgewiesen (siehe Tabelle 4).

Die Rosmarinsäure wurde mit HPLC identifiziert und quantifiziert und die Ergebnisse mit Dünnschichtchromatographie überprüft. Durch Aufzeichnung von NMR-Spektren wurde die Identität der Rosmarinsäure bestätigt (siehe unten). In *M. depressa* (Abb. 14) wurde ebenfalls Rosmarinsäure nachgewiesen, in dieser *Maranta*-Art betrug der Gehalt bis zu 1,26 % des Trockengewichts. In *M. arundinacea* (Abb. 18) und *M. noctiflora* wurde keine Rosmarinsäure gefunden. Nur in einer der neun weiteren untersuchten Gattungen der Marantaceae, *Thalia*, konnte Rosmarinsäure-Anreicherung nachgewiesen werden. In den Blättern von *T. geniculata* wurden 2,75 % des Trockengewichtes Rosmarinsäure ermittelt, *T. dealbata* enthielt hingegen keine Rosmarinsäure. In den folgenden anderen Marantaceae-Gattungen war keine Rosmarinsäure-Anreicherung nachweisbar: *Athaenidia* (1 untersuchte Art), *Calathea* (18 Arten), *Ctenanthe* (5 Arten), *Marantochloa* (1 Art), *Megaphrynium* (1 Art), *Pleiostachya* (1 Art) und *Stromanthe* (2 Arten).

Die Familie der Marantaceae gehört zur Ordnung der Zingiberales (Kress et al., 2001). Es war bereits bekannt, dass eine der acht Familien der Zingiberales, die Cannaceae, Arten mit Rosmarinsäure enthalten (Petersen und Simmonds, 2003; Yun et al., 2004). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die Familien der Marantaceae und der Cannaceae als am nächsten verwandt eingestuft werden. In einzelnen Arten aus sechs anderen Zingiberales-Familien war keine Rosmarinsäure nachweisbar, mit Ausnahme der bereits erwähnten Cannaceae.

Bei den vorliegenden Untersuchungen der Familie der Marantaceae trat meistens Chlorogensäure zusammen mit Rosmarinsäure auf. Innerhalb der Gattung *Maranta* wurde in allen Rosmarinsäure-haltigen Arten auch Chlorogensäure nachgewiesen. In *M. arundinacea* (Abb. 18) und *M. noctiflora* wurde entsprechend auch der Kaffeesäureester Chlorogensäure nicht gefunden. Obwohl die Gattung *Thalia* (Abb. 17) Rosmarinsäure enthielt, konnte Chlorogensäure hier nicht nachgewiesen werden. Umgekehrt enthielt eine *Stromanthe*-Art (*S. amabilis*) Chlorogensäure (0,55 % des Blatt-Trockengewichts), ohne dass Rosmarinsäure-Speicherung festgestellt worden wäre. Im Allgemeinen betrug der Chlorogensäure-Gehalt weniger als 0,6 % des Blatt-Trockengewichts. In einer früheren Untersuchung im Jahr 1986 wiesen Merh et al. Chlorogensäure in *Maranta arundinacea* und *M. bicolor* nach.

Tabelle 4: Rosmarinsäure-, Chlorogensäure- und Rutin-Konzentrationen in den Blättern von verschiedenen Arten der Cannaceae, Costaceae, Heliconiaceae, Löwiaceae, Marantaceae, Musaceae, Strelitziaceae und Zingiberaceae. Die Konzentrationen wurden mit HPLC bestimmt und die Identität der Substanzen mit DC bestätigt (G: Gießen, K: Kiel, M: Marburg, TG = Trockengewicht, * = Spuren)

Familie	Art	Her- kunft	Rosmarinsäure		Chlorogensäure		Rutin	
			% des Blatt-TG		% des Blatt-TG		% des Blatt-TG	
			HPLC	DC	HPLC	DC	HPLC	DC
Zingibe- rales								
Canna- ceae	<i>Canna edulis</i>	M	3,72 ± 0,08	+	0,31 ± 0,03	+	2,00 ± 0,02	+
	<i>Canna indica</i>	M	5,02 ± 0,44	+	0,42 ± 0,07	+	1,77 ± 0,10	+
Costa- ceae	<i>Costus cuspidatus</i>	M	-		-			
Helico- niaceae	<i>Heliconia humilis</i>	M	-	-	-		-	
	<i>Heliconia jacquinii</i>	M	-	-	-		-	
Löwia- ceae	<i>Orchi- dantha maxillari- oides</i>	M	-	-	-		0,16 ± 0,02	+
Musa- ceae	<i>Musa acuminata</i>	M	-	-	-		-	
	<i>Musa textilis</i>	M	-	-	-		-	
Maranta- ceae	<i>Ataenidia conferta</i>	K	-	-	-	-	-	-
	<i>Calathea argyraea</i>	G	-	-	-	-	-	-
	<i>Calathea bacha- miana</i>	G	-	-	-	-	-	-
	<i>Calathea insignis</i>	M	-	-	-	-	-	-
	<i>Calathea kegeliana</i>	M	-	-	-	-	-	-
	<i>Calathea lancifolia</i>	G	-	-	-	-	-	-
	<i>Calathea lindeniana</i>	M	-	-	-	-	-	-
	<i>Calathea lietzei</i>	G	-	-	-	-	-	-
	<i>Calathea louisae</i>	M	-	-	-	-	-	-
	<i>Calathea makoyana</i>	M	-	-	-	-	-	-
	<i>Calathea mediopicta</i>	G	-	-	-	-	-	-

	<i>Calathea micans</i>	M	-	-	-	-	-	-
	<i>Calathea ornata</i>	M	-	-	-	-	-	-
	<i>Calathea picturata</i>	G	-	-	-	-	-	-
	<i>Calathea rotundifolia</i>	K	-	-	-	-	-	-
	<i>Calathea undulata</i>	G	-	-	-	-	$8,46 \pm 0,03$	+
	<i>Calathea variegata</i>	M	-	-	-	-	$4,3 \pm 0,4$	+
	<i>Calathea warscewiczii</i>	K	-	-	-	-	$0,18 \pm 0,4$	+
	<i>Calathea zebrina</i>	M	-	-	-	-	-	-
	<i>Ctenanthe burlemarxii</i>	M	-	-	-	-	-	-
	<i>Ctenanthe kummeriana</i>	G	-	-	-	-	$0,21 \pm 0,1$	+
	<i>Ctenanthe lubbersiana</i>	G	-	-	-	-	$0,53 \pm 0,15$	+
	<i>Ctenanthe pilosa</i>	K	-	-	-	-	-	-
	<i>Ctenanthe setosa</i>	K	-	-	-	-	$0,81 \pm 0,03$	+
	<i>Maranta arundinacea</i>	K	-	-	-	-	$0,99 \pm 0,01$	+
	<i>Maranta depressa</i>	K	$1,26 \pm 0,06$	+	$0,28 \pm 0,04$	+	$2,8 \pm 0,2$	+
	<i>Maranta leuconeura „Fascinator”</i>	M	$0,87 \pm 0,07$	+	$0,17 \pm 0,02$	+	$5,76 \pm 0,12$	+
	<i>Maranta leuconeura „Kercho-viana”</i>	M	$0,81 \pm 0,02$	+	$0,09 \pm 0,02$	+	$4,7 \pm 0,09$	+
	<i>Maranta leuconeura „Massangeana”</i>	G	$0,78 \pm 0,08$	+	$0,17 \pm 0,01$	+	$4,01 \pm 0,4\sim$	+
	<i>Maranta noctiflora</i>	G	-	-	-	-	-	-
	<i>Marantochloa flexuosa</i>	M	-	-	-	-	-	-
	<i>Megaphrynium macrostachyum</i>	M	-	-	-	-	-	-

	<i>Pleio-stachya pruinosa</i>	M	-	-	-	-	$3,98 \pm 0,13$	+
	<i>Stromanthe amabilis</i>	G	-	-	$0,55 \pm 0,02$	+	-	-
	<i>Stromanthe sanguinea</i>	G	-	-	-	-	-	-
	<i>Thalia geniculata</i>	M	$2,75 \pm 0,04$	+	-	-	-	-
	<i>Thalia dealbata</i>	M	-	-	-	-	$0,49 \pm 0,02$	+
Strelitzia- ceae	<i>Strelitzia reginae</i>	M	-	-			$0,41 \pm 0,03$	+
Zingi- beraceae	<i>Curcuma longa</i>	M	-		-		-	
	<i>Globba marantina</i>	M	-		-		-	
	<i>Zingiber officinalis</i>	M	$0,03^*$	-	-	-	-	

In beiden untersuchten *Canna*-Arten der Familie Cannaceae, *C. edulis* (Abb. 16) und *C. indica* (Abb. 15), war zusammen mit Rosmarinsäure eine niedrige Konzentration Chlorogensäure vorhanden, während in allen anderen Arten der Zingiberales-Familien Chlorogensäure nicht nachweisbar war. Die Biosynthese von Rosmarinsäure und Chlorogensäure erfolgt durch verwandte Enzyme. Hierbei handelt es sich um Hydroxycinnamoyltransferasen, die zur Superfamilie der BAHD-Acyltransferasen (Hoffmann et al., 2003; D'Auria, 2006; Berger et al., 2006) gehören. Bisher wurden weder Enzyme der Marantaceae noch der Cannaceae beschrieben, die für die Übertragung des Hydroxyzimtsäurerests auf Hydroxyphenylmilchsäuren oder Chinasäure verantwortlich sind. Die Untersuchung der evolutionären Verwandtschaft zwischen diesen Acyltransferasen und den aus Dikotyledonen-Pflanzenarten bekannten ist eine interessante Fragestellung.

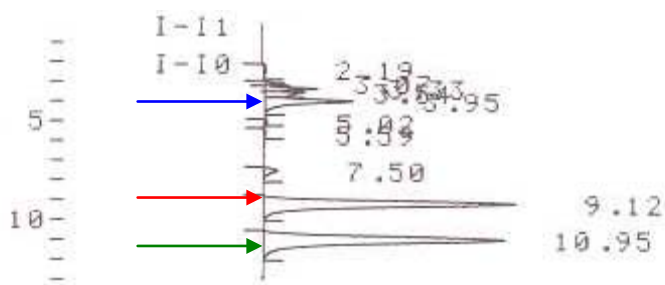


Abb. 13: HPLC-Chromatogramm eines Extrakts aus *Maranta leuconeura*. Der blaue Pfeil deutet auf den Peak für Chlorogensäure, der rote auf Rosmarinsäure und der grüne auf Rutin. Retentionzeiten: Rosmarinsäure 9,12, Chlorogensäure 3,95, Rutin 10,95.

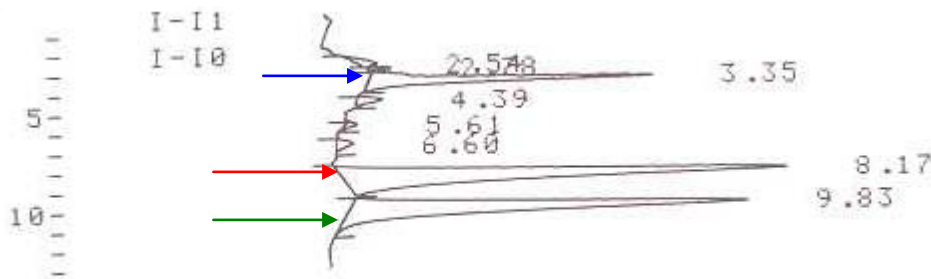


Abb. 14: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Maranta depressa*. Der blaue Pfeil deutet auf den Peak für Chlorogensäure, der rote auf Rosmarinsäure, und der grüne auf Rutin. Retentionzeiten: Rosmarinsäure 8,17, Chlorogensäure 3,35, Rutin 9,83.

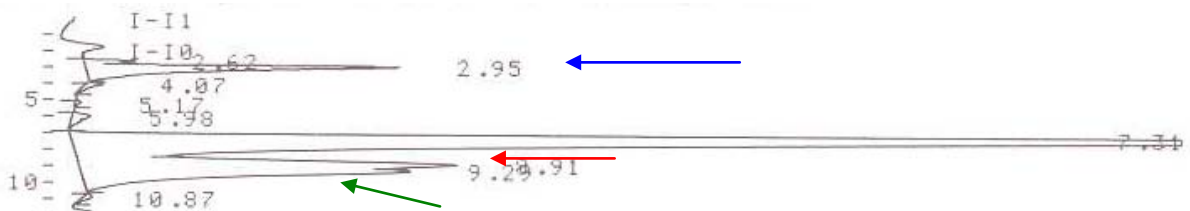


Abb. 15: HPLC Chromatogram eines Extraktes aus *Canna indica*. Der blaue Pfeil deutet auf den Peak für Chlorogensäure, der rote auf Rosmarinsäure, und der grüne auf Rutin. Retentionzeit von Rosmarinsäure: 8,91 und von Chlorogensäure: 2,95 und von Rutin: 9,29.

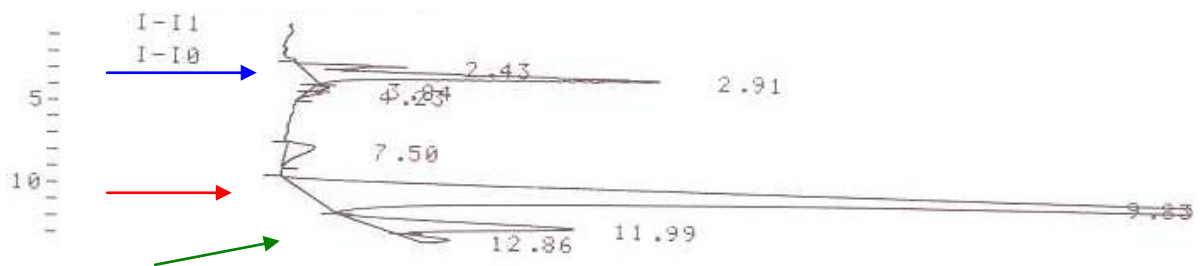


Abb. 16: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Canna edulis*. Der blaue Pfeil deutet auf den Peak für Chlorogensäure, der rote auf Rosmarinsäure, und der grüne auf Rutin. Retentionzeit von Rosmarinsäure: 9,83 und von Chlorogensäure: 2,91 und von Rutin: 11,99.

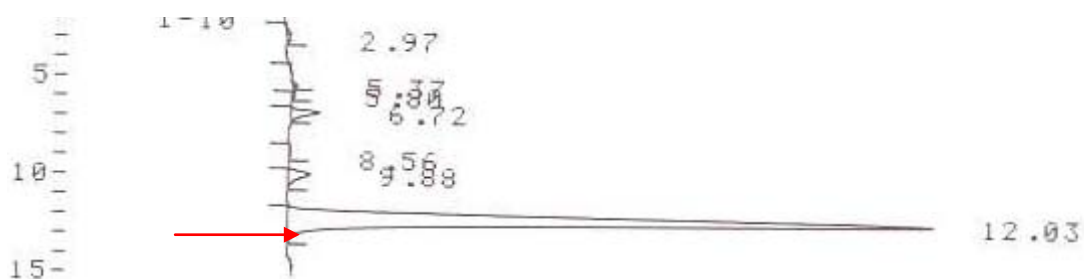


Abb. 17: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Thalia geniculata*. Der rote Pfeil deutet auf den Peak für Rosmarinsäure. Retentionzeit von Rosmarinsäure: 12,03.

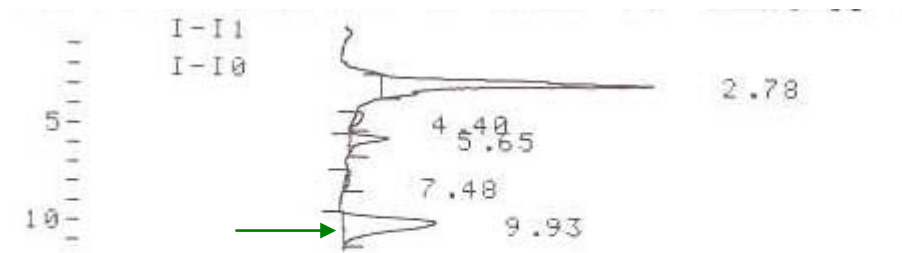


Abb. 18: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Maranta arundinacea*. Der grüne Pfeil deutet auf den Peak für Rutin. Retentionzeit von Rutin: 9,93.

Nachweis von Rutin in Marantaceae und verwandten Familien

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Akkumulation von Rutin (Quercetin-3-O-rutinosid) in folgenden verschiedenen Gattungen der Marantaceae gezeigt: *Calathea*, *Ctenanthe*, *Maranta* (Abb. 3, 4, 8), *Pleiostachya* und *Thalia*. Auch für Rutin gilt, dass die Substanz nicht in allen Arten einer bestimmten Gattung nachgewiesen werden konnte. So wurde Rutin z. B. nur in 3 von 18 untersuchten *Calathea*-Arten gefunden. Das Vorkommen von Rutin war zuvor schon in *Maranta leuconeura* var. *kerchoviana* und var. *massangeana* beschrieben worden (Williams und Harborne, 1977). In dieser Dissertation wurde Rutin außerdem in *Orchidantha maxillarioides* (Löwiaceae), *Strelitzia reginae* (Strelitziaceae) sowie in *Canna edulis* (Abb. 16) und *Canna indica* (Abb. 15), aber nicht in den untersuchten Arten anderer Zingiberales-Familien nachgewiesen. Im Jahr 2007 hatte Zaghloul bereits Rutin in *Canna indica* nachgewiesen. Williams und Harborne (1977) untersuchten 81 Arten der Zingiberales in Bezug auf das Vorkommen von Flavonoiden in den Blättern. Sie stellten fest, dass nur in den beiden Familien Marantaceae und Zingiberaceae eine größere Vielfalt an Flavonoiden vorliegt. Innerhalb der Zingiberaceae waren die Flavonole Kämpferol und Quercetin sowie die Proanthocyanidine weit verbreitet. Die Familie der Marantaceae wies die größte Vielfalt an Flavonoiden auf, hier wurden Flavonole (außer Kämpferol und Isorhamnetin als Aglycone), Flavone als O- und C-Glycoside und Anthocyane (Cyanidin und Delphinidin-3-O-rutinosid) identifiziert. In den Gattungen *Maranta* und *Stromanthe* wurden sulfatierte Verbindungen nachgewiesen. Leider wurden nur *Maranta leuconeura* und *Stromathe sanguinea* sowohl von Williams und Harborne (1977) als auch in der vorliegenden Arbeit untersucht, jedoch

stimmen die Ergebnisse für diese beiden Arten in Bezug auf Rutin überein. Frühere Studien von Bate-Smith (1968) und Adesina (1978) bezogen sich nur auf wenige Marantaceae-Arten. Die Identifizierung von Quercetin in *Thalia dealbata* (Bate-Smith, 1968) stimmt mit dem Nachweis von Quercetin-3-O-rutinosid in der vorliegenden Arbeit überein. Hingegen konnte Rutin nicht in *Calathea lietzei* nachgewiesen werden, obwohl Bate-Smith (1968) das Aglycon Quercetin in dieser Pflanze nachgewiesen hatte. Dies weist wahrscheinlich darauf hin, dass unterschiedliche Zucker an das Aglycon gebunden sind. Nach Williams und Harborne (1977) tritt Quercetin als Flavonol-Aglycon in allen Familien der Zingiberales außer in den Löwiaceae auf, von denen nur eine Art, *Orchidantha maxillarioides*, untersucht wurde. Nach Ansicht der Autoren erschwerte die geringe Menge an Sekundärstoffen in dieser Art die Detektion von bestimmten Substanzen. In der vorliegenden Arbeit wurde Rutin in *O. maxillarioides* in geringer Konzentration nachgewiesen (0,16 % des Blatt-Trockengewichts).

Rosmarinsäure, Chlorogensäure und Rutin als chemotaxonomische Marker?

Die bisherigen phylogenetischen Untersuchungen der Marantaceae basieren sowohl auf morphologischen als auch auf molekularbiologischen Daten (Andersson und Chase, 2001; Prince und Kress, 2006). Andersson und Chase (2001) untersuchten 21 Gattungen in Bezug auf morphologische Befunde sowie Sequenzdaten des *rps16*-Introns der Plastiden-DNA. Die Ergebnisse unterstützten die vorherige Unterteilung der Marantaceae in fünf Gruppen (*Phrynium*, *Maranta*, *Calathea*, *Myrosma*, *Donax*) und einige Gattungen mit unsicherer Einordnung, darunter *Thalia*, nicht (Andersson, 1998). Die *Donax*-Gruppe wurde als paraphyletisch beschrieben und die *Maranta*- und *Phrynium*-Gruppe als polyphyletisch. Für einige Gattungen wurde gezeigt, dass sie nicht monophyletisch sind. Die RA-enthaltenden Pflanzen aus der vorliegenden Arbeit wurden nicht als nahe verwandt erkannt. Prince und Kress (2006) führten eine kombinierte Analyse von morphologischen und Sequenzdaten verschiedener Plastiden-DNAs (*matK* und die 3'-intergenische Spacerregion sowie die *trnL-F*-intergenische-Spacerregion) durch. Fünf Kladen wurden durch die gemeinsame Auswertung aller Daten identifiziert, nämlich die *Calathea*-, *Donax*-, *Maranta*-, *Stachyphrynium*- und die *Sarcophrynium*-Klade. Die Rosmarinsäure-haltigen Gattungen wurden in zwei unterschiedliche Kladen

eingeordnet: *Maranta* befindet sich in der *Maranta*-Klade und *Thalia* in der *Donax*-Klade. Rutin konnte von Prince und Kress (2006) in manchen, aber nicht in allen Arten der *Calathea*-, *Maranta*- und *Donax*-Kladen nachgewiesen werden. Aus der gemeinsamen Betrachtung der von Andersson und Chase (2001) sowie von Prince und Kress (2006) ermittelten phylogenetischen Daten und der limitierten Untersuchung des Auftretens von Rosmarinsäure, Chlorogensäure und Rutin in der vorliegenden Arbeit kann gefolgert werden, dass die chemischen Marker nicht für die chemotaxonomische Klassifizierung der Marantaceae eingesetzt werden können. Dies war zu erwarten, da das Vorkommen einer bestimmten Verbindung sogar innerhalb einer Art nicht einheitlich ist.

Zur eindeutigen Identifizierung von Rosmarinsäure und Rutin in Extrakten aus *Maranta leuconeura* "Fascinator" wurden die Substanzen präparativ gereinigt und für eine ^1H -NMR-Analyse zu Dr. Bernd Schneider, Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena geschickt.

Die in mehreren Injektionen aus der HPLC-Säule eluierenden "Peaks" von RA und Rutin wurden aufgefangen, am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und in Methanol aufgenommen. Zur weiteren Reinigung wurden sie auf Kieselgel 60 F₂₅₄-Platten aufgetragen und in Ethylacetat/Chloroform/Ameisensäure 50:40:10 entwickelt. Die Banden von RA und Rutin wurden ausgekratzt und das Kieselgelmateriale je dreimal mit Methanol extrahiert. Die getrockneten Extrakte wurden zur weiteren Analyse verschickt.

Die ermittelten ^1H NMR-Daten stimmten weitgehend mit bereits publizierten Daten (Kuhnt et al., 1994) überein.

^1H NMR-Daten von Rosmarinsäure aus *Maranta leuconeura*:

^1H NMR (500 MHz; MeOH- d_3): δ 7,54 (1H, *d*, *J* = 15,8 Hz, H-7), 7,04 (1H, *d*, *J* = 2,1 Hz, H-2), 6,95 (1H, *dd*, *J* = 8,2, 2,1 Hz, H-6), 6,77 (1H, *d*, *J* = 8,2 Hz, H-5), 6,74 (1H, *d*, *J* = 2,1 Hz, H-2'), 6,69 (1H, *d*, *J* = 8,1 Hz, H-5'), 6,60 (1H, *dd*, *J* = 8,1, 2,1 Hz, H-6'), 5,17 (1H, *dd*, *J* = 8,5, 4,3 Hz, H-8'), 3,09 (1H, *dd*, *J* = 14,3, 4,3 Hz, H-7'a), 3,00 (1H, *dd*, *J* = 14,3, 8,5 Hz, H-7'b).

^1H NMR-Daten von Rosmarinsäure aus *Hyptis verticillata* (Kuhnt et al., 1994):

^1H NMR (500 MHz; MeOH- d_3): δ 7,5 (1H, *d*, *J* = 15,8 Hz, H-8), 7,03 (1H, *d*, *J* = 2,3 Hz, H-2), 6,92 (1H, *dd*, *J* = 8,3, 2,3 Hz, H-6), 6,76 (1H, *d*, *J* = 8,3 Hz, H-5), 6,77 (1H,

d , $J = 2,3$ Hz, H-2'), 6,67 (1H, d , $J = 8,3$ Hz, H-5'), 6,62 (1H, dd , $J = 8,3, 2,3$ Hz, H-6'), 6,25 (1H, d , $J = 15,8$ 5 Hz, H-7), 5,09 (1H, dd , $J = 8,8, 5,3$ Hz, H-8'), 3,10 (1H, dd , $J = 14,3, 5,3$ Hz, H-7'a), 2,93 (1H, dd , $J = 14,3, 9,8$ Hz, H-7,9'b).

In Abb. 19 sind Vergleichschromatogramme der aus *Maranta leuconeura* aufgereinigten Rosmarinsäure und eines Rosmarinsäurestandards mit einer sehr guten Übereinstimmung gezeigt.

Identifizierung von Rosmarinsäure

^1H NMR 500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$

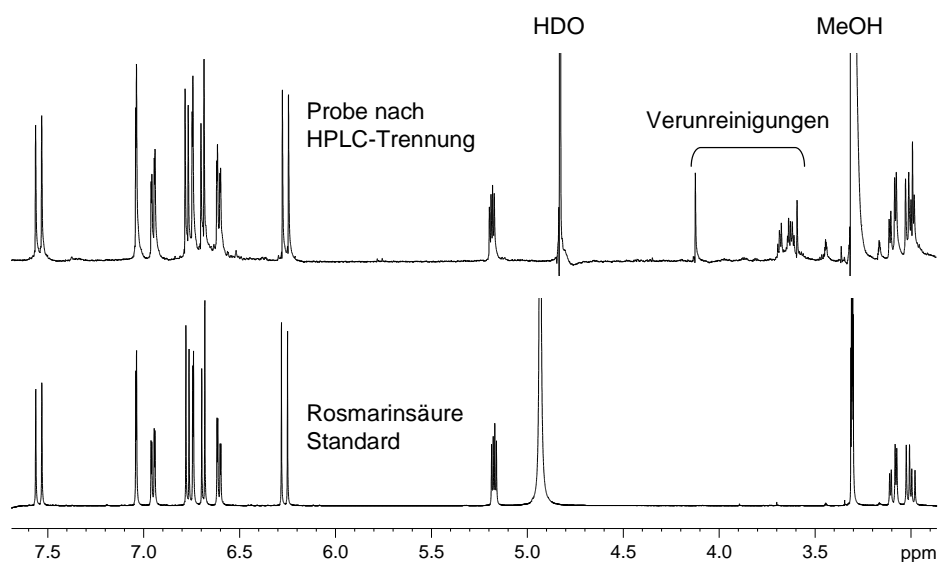


Abbildung 19: ^1H -NMR Daten der aus *Maranta leuconeura* aufgereinigten Rosmarinsäure-Peaks und eines Rosmarinsäure-Standards.

Ein weiterer dominanter Peak im HPLC-Chromatogramm eines Extrakts aus *Maranta leuconeura* wurde mittels ^1H -NMR als Rutin identifiziert. Vergleichschromatogramme (Abb. 20) zeigten die Übereinstimmung der Probe mit einem Rutin-Standard.

^1H NMR-Daten von Rutin:

^1H NMR (500 MHz; $\text{MeOH-}d_3$): δ 7,66 (1H, d , $J = 2,2$ Hz, H-2'), 7,63 (1H, dd , $J = 8,4, 2,2$ Hz, H-6'), 6,85 (1H, d , $J = 8,4$ Hz, H-5'), 6,28 (1H, d , $J = 2,0$ Hz, H-8), 6,11 (1H, d ,

$J = 2,0$ Hz, H-6), 5,05 (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz, H-1''), 4,52 (1H, *d*, $J = 1,6$ Hz, H-1'''), 3,83–3,35 (10H, H-2''-H-6'' and H-2'''-H-5'''), 1,13 (3H, *d*, $J = 6,2$ Hz, H-6''').

Identifizierung von Rutin

^1H NMR 500 MHz

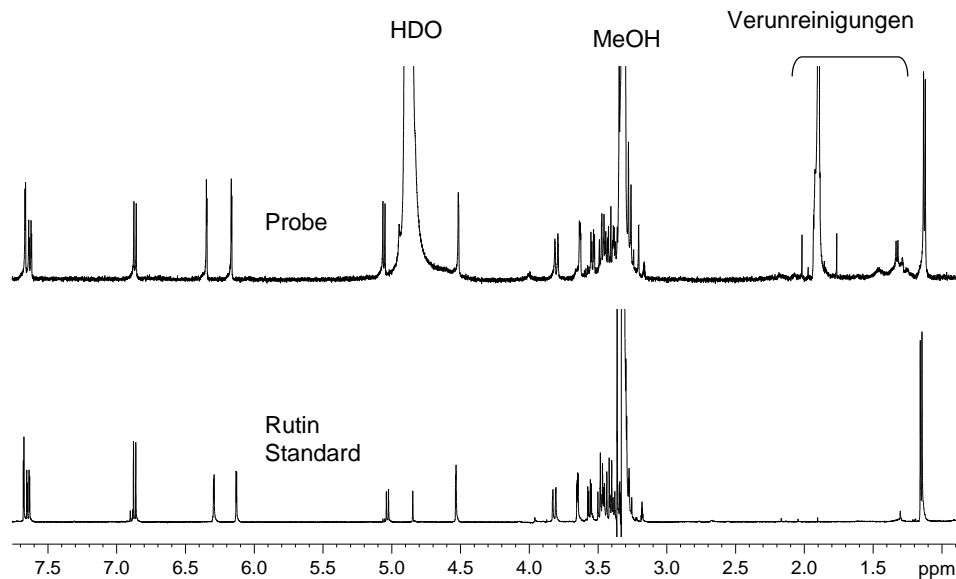


Abbildung 20: ^1H -NMR Daten des aus *Maranta leuconeura* aufgereinigten Rutin-Peaks und eines Rutin-Standards.

3.3. Eudikotyledonen

3.3.1. Asteriden

3.3.1.1. Familie Cornaceae

Vier verschiedene Polyphenole (Glucogallin, (+)-Catechin, (+)-Gallocatechin und Procyanidin B-3) wurden aus Kallus- und Suspensionskulturen von *Cornus kousa* isoliert (Ishimaru et al., 1993). Im Jahr 1998 konnte gezeigt werden, dass acht verschiedene *Cornus*-Arten bzw. -Varietäten (*C. kousa* var. *chinensis*, *C. kousa* 'Milky Way', 'Gold Star', 'Satomi', 'Snowboy', *C. capitata* 'Mountain Moon', *C. drummodii* 'Eddie's White Wonder' und *C. officinalis*) Polyphenole produzieren. Das Hauptpolyphenol ist Monogalloylglucose (β -Glucogallin). Zellkulturen der genannten

Arten produzieren ebenfalls die entsprechenden Polyphenole (Tanaka et al., 1998). Chlorogensäure wurde aus drei Arten von *Hydrostachys* (Hydrostachyaceae, Cornales) isoliert (Ronsted et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Arten von *Cornus* (*C. alba*, *C. mas*, *C. officinalis*) untersucht. Rosmarinsäure oder Chlorogensäure konnten nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Rosmarinsäure- und Chlorogensäure-Konzentrationen in Blättern von verschiedenen Arten der Cornaceae. Die Konzentrationen wurden mit HPLC bestimmt und die Identität der Substanzen mit DC bestätigt (M: Marburg, TG = Trockengewicht).

Familie	Art	Her- kunft	Rosmarinsäure		Chlorogensäure	
			% des Blatt-TG		% des Blatt-TG	
			HPLC	DC	HPLC	DC
Cornales						
Cornaceae	<i>Cornus alba</i>	M	-		-	
	<i>Cornus mas</i>	M	-		-	
	<i>Cornus officinalis</i>	M	-		-	-

3.3.2. Euasteriden I

3.3.2.1. Familie Boraginaceae

Lange Zeit ging man davon aus, dass die Lamiaceae und Boraginaceae nahe verwandt sind. Jedoch stellten Grayer et al. (1999) durch molekularbiologische Untersuchungen der *rbcL* Sequenzen fest, dass die Familie der Solanaceae anstatt mit den Lamiaceae sehr nahe verwandt mit der Familie der Boraginaceae ist. Im Jahr 2009 veröffentlichte schließlich die Angiospermen-Phylogenie-Gruppe die aktuelle Klassifikation (APGIII). Dabei wurden die Boraginaceae ohne Einordnung in eine Ordnung in die Lamiales eingeordnet (Chase, 2009).

Rosmarinsäure wurde im Jahr 1966 zum ersten Mal in den Hydrophyllaceae entdeckt (Harborne, 1966), die später den Boraginaceae zugeordnet wurden. Im Jahr 1975 wurde festgestellt, dass Rosmarinsäure wahrscheinlich in allen Boraginaceae-Arten vorkommt (Kelly et al., 1975).

Im Jahr 1988 postulierten Molgaard und Ravn, dass Monosaccharid-Ester der Kaffeesäure in den Dikotyledonen vorkommen. Chlorogensäure soll verbreitet in Asteraceae, Solanaceae and Rubiaceae enthalten sein, wogegen das Vorkommen

von Rosmarinsäure auf die Lamiaceae und Boraginaceae beschränkt ist (Molgaard und Ravn, 1988). Wie schon in der Einleitung (Tabelle 1) gezeigt wurde, ist diese Ansicht heutzutage überholt. Darüber hinaus wurden auch mehrere Flavonoide, Flavone und Flavonole in verschiedenen Arten von *Heliotropium* isoliert (Urzara et al., 2000).

Tabelle 6: Rosmarinsäure- und Chlorogensäure-Konzentrationen in den Blättern von verschiedenen Arten der Boraginaceae. Die Konzentrationen wurden mit HPLC bestimmt und die Identität der Substanzen mit DC bestätigt (M: Marburg, TG = Trockengewicht, * = Spuren).

Familie	Art	Her- kunft	Rosmarinsäure		Chlorogensäure	
			% von Blätter-TG		% von Blätter-TG	
			HPLC	DC	HPLC	DC
Boragina- ceae	<i>Buglossoides arvensis</i>	M	3,00 ± 0,14	+	-	-
	<i>Cerinthe major</i>	M	2,60 ± 0,60	+	-	-
	<i>Echium italicum</i>	M	0,13 ± 0,03	+	3,83 ± 0,17	+
	<i>Heliotropium amplexicaule</i>	M	5,20 ± 0,20	+	-	-
	<i>Hydrophyllum canadense</i> (2006)	M	5,85 ± 0,25	+	0,10 ± 0,01	+
	<i>Hydrophyllum canadense</i> (2007)		4,99 ± 0,37		0,03 *	
	<i>Hydrophyllum virginicum</i>	M	4,28 ± 0,27	+	-	-
	<i>Lindelofia longiflora</i>	M	0,86 ± 0,14	+	-	-
	<i>Nemophila menziesii</i>	M	0,32 ± 0,03	+	1,17 ± 0,07	+
	<i>Nonea lutea</i> (2007)	M	4,18 ± 0,18	+	1,76 ± 0,09	+
	<i>Nonea lutea</i> (2007)	M	1,62 ± 0,08		0,18 ± 0,10	
	<i>Symphytum officinale</i>	M	1,95 ± 0,14	+	-	-
	<i>Symphytum uplandicum</i>	M	3,60 ± 0,10	+	-	-

In der vorliegenden Studie wurden neun Gattungen und elf Arten der Boraginaceae untersucht: *Buglossoides arvensis* (Abb. 21), *Cerinthe major* (Abb. 22), *Echium italicum* (Abb. 23), *Heliotropium amplexicaule* (Abb. 24), *Hydrophyllum canadense* (Abb. 25), *Hydrophyllum virginicum* (Abb. 26), *Lindelofia longiflora* (Abb. 27), *Nemophila menziesii* (Abb. 28), *Nonea lutea* (Abb. 29), *Symphytum officinale* (Abb. 30) und *Symphytum uplandicum* (Abb. 31). Die Ergebnisse bestätigen die Befunde von Kelly et al. (1975), da in allen untersuchten Arten Rosmarinsäure gefunden wurde (siehe Tabelle 5), aber in unterschiedlichen Konzentrationen. Am meisten Rosmarinsäure wurde in *Hydrophyllum canadense* gefunden (5,85%) gefolgt von *Heliotropium amplexicaule* (5,20%). Auffällig ist hier, dass die erste Art nur sehr

wenig und die zweite Art überhaupt keine Chlorogensäure produziert. Vergleichbare Rosmarinsäurekonzentrationen wurden in *Hydrophyllum virginicum* und in *Nonea lutea* gefunden, Chlorogensäure jedoch nur in letzterer. Chlorogensäure konnte nur in vier Arten gefunden werden (*Echium italicum*, *Hydrophyllum canadense*, *Nemophila menziesii*, *Nonea lutea*) (Tabelle 6).

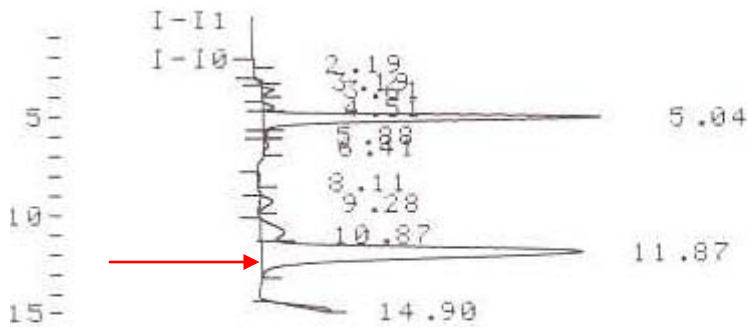


Abb. 21: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Buglossoides arvensis*. Der rote Pfeil deutet auf den Peak für Rosmarinsäure. Retentionszeit von Rosmarinsäure: 11,87.

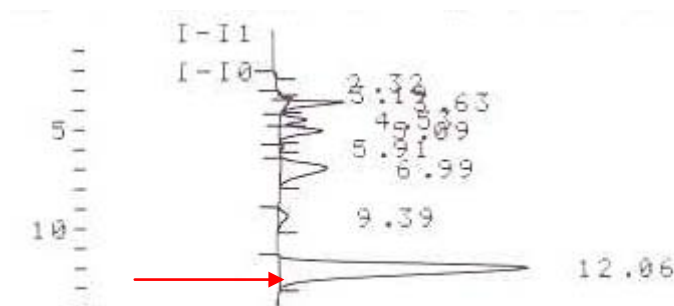


Abb. 22: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Cerinthe major*. Der rote Pfeil deutet auf den Peak für Rosmarinsäure. Retentionszeit von Rosmarinsäure: 12,06.

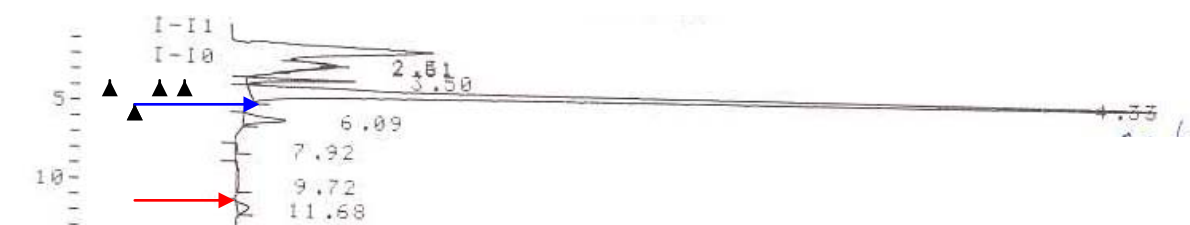


Abb. 23: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Echium italicum*. Der blaue Pfeil deutet auf den Peak für Chlorogensäure, der rote auf Rosmarinsäure. Retentionszeit von Rosmarinsäure: 11,68 und von Chlorogensäure: 4,33.

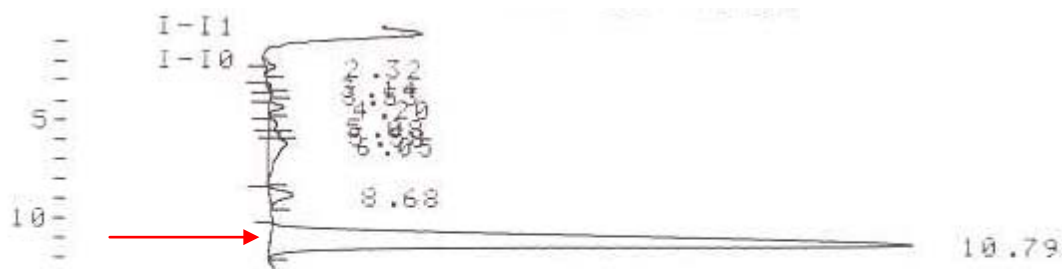


Abb. 24: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Heliotropium amplexicaule*. Der rote Pfeil deutet auf den Peak für Rosmarinsäure. Retentionszeit von Rosmarinsäure: 10,79.

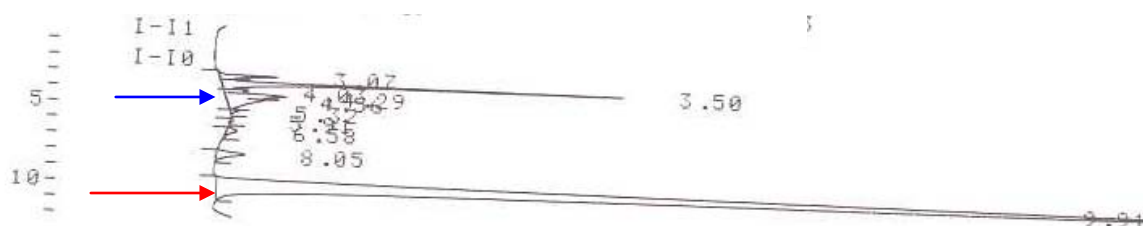


Abb. 25: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Hydrophyllum canadense*. Der blaue Pfeil deutet auf den Peak für Chlorogensäure, der rote auf Rosmarinsäure. Retentionszeit von Rosmarinsäure: 9,91 und von Chlorogensäure: 4,29.

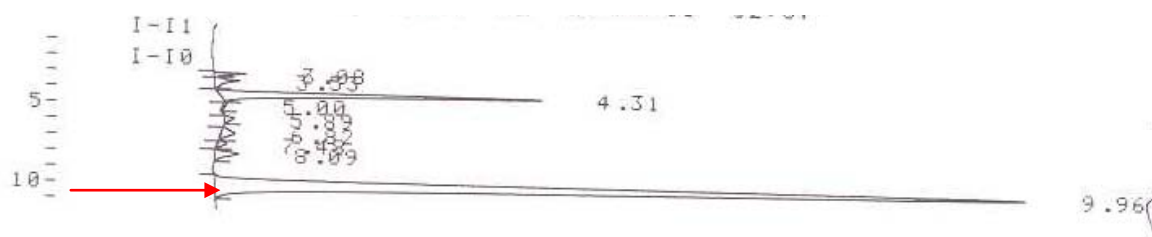


Abb. 26: HPLC-Chromatogramm von *Hydrophyllum virginicum*. Der rote Pfeil deutet auf den Peak für Rosmarinsäure. Retentionszeit von Rosmarinsäure: 9,96.

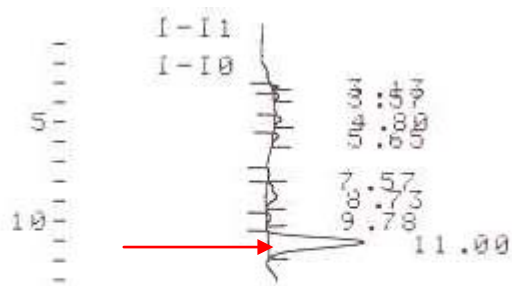


Abb. 27: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Lindelofia longiflora*. Der rote Pfeil deutet auf den Peak für Rosmarinsäure. Retentionszeit von Rosmarinsäure: 11,00.

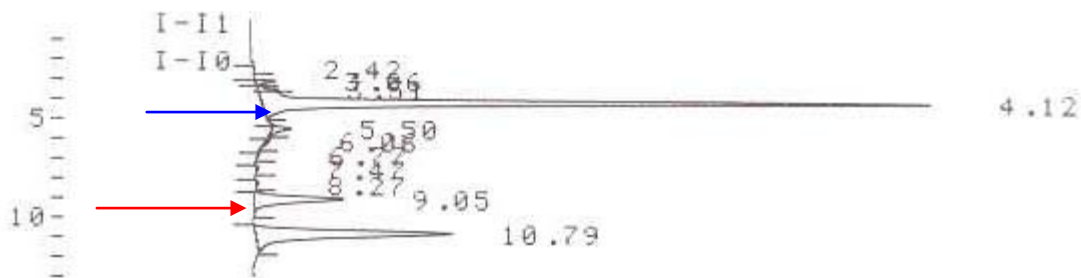


Abb. 28: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Nemophila menziesii*. Der blaue Pfeil deutet auf den Peak für Chlorogensäure, der rote auf Rosmarinsäure. Retentionszeit von Rosmarinsäure: 10,79 und von Chlorogensäure: 4,12.

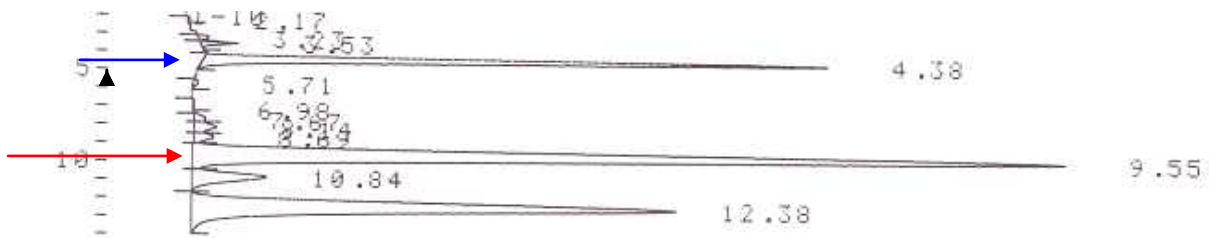


Abb. 29: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Nonea lutea*. Der blaue Pfeil deutet auf den Peak für Chlorogensäure, der rote auf Rosmarinsäure. Retentionszeit von Rosmarinsäure: 9,55 und von Chlorogensäure: 4,38.

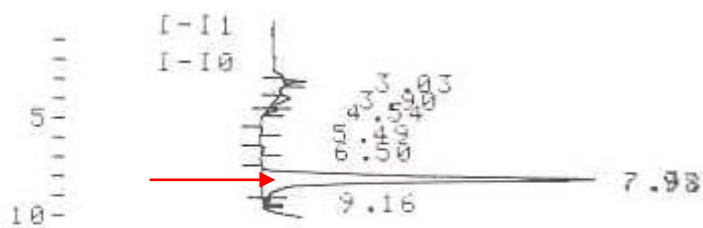


Abb. 30: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Symphytum officinale*. Der rote Pfeil deutet auf den Peak für Rosmarinsäure. Retentionszeit von Rosmarinsäure: 7,98.

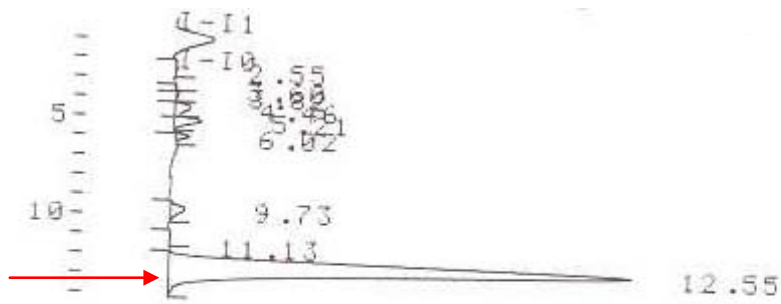


Abb. 31: HPLC Chromatogram eines Extraktes aus *Symphytum uplandicum*. Der rote Pfeil deutet auf den Peak für Rosmarinsäure. Retentionszeit von Rosmarinsäure: 12,55.

3.3.2.2. Ordnung Gentiales

3.3.2.2.1. Familie Apocynaceae

Tabelle 7: Rosmarinsäure- und Chlorogensäure-Konzentrationen in den Blättern von verschiedenen Arten der Apocynaceae, Asclepiadaceae, Gentianaceae, Rubiaceae, Acanthaceae und Gesneriaceae. Die Konzentrationen wurden mit HPLC bestimmt und die Identität der Substanzen mit DC bestätigt (M: Marburg, TG = Trockengewicht, * = Spuren).

Familie	Art	Her- kunft	Rosmarinsäure		Chlorogensäure	
			% des Blatt-TG		% des Blatt-TG	
			HPLC	DC	HPLC	DC
Gentianales						
Apocynaceae	<i>Catharanthus roseus</i>	M	-		0,46 ± 0,02	+
Asclepiadaceae	<i>Asclepias syriaca</i>	M	-	-	-	
	<i>Asclepias syriaca</i> (200 mg)	M	-	-	-	-
Gentianaceae	<i>Gentiana asclepiadea</i>	M	-	-	-	-
	<i>Gentiana lutea</i>	M	-	-	-	-
Rubiaceae	<i>Galium boreale</i>	M	-	-	2,35 ± 0,09	+
	<i>Galium rubioides</i>	M	-	-	0,52 ± 0,03	+
	<i>Phuopsis stylosa</i>	M	-		-	
	<i>Rubia tinctoria</i>	M	-	-	0,55 ± 0,05	+

Sakushima und Nishibe (1988) haben aus *Trachelospermum jasminoides* var. *pubescens* (Apocynaceae) ein neues Dihydroflavonol (Taxifolin-3-arabinosid), Flavonoide und Chlorogensäure isoliert. Chlorogensäure wurde in der vorliegenden Arbeit in *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) gefunden, Rosmarinsäure konnte aber nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 7). Im Jahr 2007 haben Grundmann und Butterweck *Apocynum venetum* analysiert. Diese Pflanze enthält hohe Konzentrationen von Flavonen, Flavonoiden und Kaffeesäurederivaten.

3.3.2.2.2. Familie Asclepiadaceae

Aus *Cynanchum acutum* L. (Asclepiadaceae, neuerdings zusammen mit den Apocynaceae) konnten Quercetin and Quercetin-3-O- β -D-galactosid isoliert werden (El Sayed et al., 1994). Später konnten Heneidak et al. (2006) mehrere Flavonoidglycoside aus 12 Arten der Asclepiadaceae bestimmen: Quercetin-di-O-hexosid, Quercetin-3-O-rhamnosyl(1 \rightarrow 2)glycosid, Quercetin-3-O-galactosid und Quercetin-3-O-xylosid und andere. Kürzlich wurden Cumarine, Scopoletin und Scoparon aus *Cynanchum acutum* isoliert und mit $^1\text{H-NMR}$ und GC/MS gemessen (El-Demerdash et al., 2009).

Hier wurde nur *Asclepias syriaca* untersucht, und es wurden weder Rosmarinsäure noch Chlorogensäure nachgewiesen (siehe Tabelle 7).

3.3.2.2.3. Familie Gentianaceae

Gentiana asclepiadea und *Gentiana lutea* wurden untersucht. Beide bilden weder Rosmarinsäure noch Chlorogensäure (Tabelle 7). Bis jetzt konnten Triterpenoide, Lignane, Flavone und phenolische Glycoside aus *Gentiana rigescens* isoliert und gemessen werden (Xu et al., 2006).

3.3.2.2.4. Familie Rubiaceae

In den Rubiaceae (Gentiales) konnten Aquino et al. (1990) Rosmarinsäure in *Hamelia patens* finden, auch *Rubia tinctorum* enthält nach neueren Untersuchungen Rosmarinsäure (Boldizsar et al., 2006). Innerhalb der Familie der Rubiaceae ist Chlorogensäure insbesondere aus *Coffea* bekannt (Morishita et al., 1986).

Molgaard und Ravn (1988) postulierten eine Korrelation zwischen dem Vorkommen von Kaffeesäurederivaten und der taxonomischen Gliederung der Pflanzenfamilien und -ordnungen. Chlorogensäure soll demnach in Asteraceae, Solanaceae und Rubiaceae verbreitet sein, wogegen Rosmarinsäure nur in Lamiaceae und Boraginaceae vorkommt. Diese Ansicht ist heutzutage mehrfach widerlegt, wie aus der Einleitung und Tabelle 1 ersichtlich ist.

Im Jahr 2007 analysierten Da Silva et al. *Aliberta sessilis* (Rubiaceae). Dabei wurden verschiedene Phenolglycoside, zwei Phenolsäuren (Chlorogensäure und Salicylsäure) sowie D-Mannitol isoliert und identifiziert.

In dieser Studie wurden vier Arten untersucht, in denen keine Rosmarinsäure gefunden werden konnte. *Galium boreale*, *Galium rubioides*, *Rubia tinctoria* produzieren jedoch Chlorogensäure, nur in *Phuopsis stylosa* konnte keine Chlorogensäure gefunden werden (siehe Tabelle 7).

3.3.2.3. Ordnung Lamiales

3.3.2.3.1. Familie Acanthaceae

Phenole, Flavonoide und 9'-Decarboxy-Rosmarinsäure-4'-O-(1→4)-Galactosyl rhamnosid wurden in *Blepharis ciliaris* (Acanthaceae) identifiziert (Afifi 2003).

Satyanarayana et al. (1978) haben Chlorogensäure aus *Andrographis paniculata* (Acanthaceae) isoliert. In der vorliegenden Arbeit konnte in den untersuchten Arten (*Acanthus hungaricus*, *Acanthus longifolius*, *Barleria micans*, *Jacobinia zelandia*, *Odontonema schomburgkianum*) keine Rosmarinsäure nachgewiesen werden. Chlorogensäure konnte nur in *Barleria micans* gefunden werden (siehe Tabelle 8).

3.3.2.3.2. Familie Gesneriaceae

Cañigüeral et al. entdeckten 1996 in *Ramonda myconi* (Gesneriaceae) zwei neue Polyphenolglycoside (Myconosid und Hispidulin-8-C-β-D-Galactopyranosid). Segawa et al. (1999) berichteten, dass 14 phenolische Substanzen (fünf Flavonoide, zwei Anthrachinone und ein Isoflavon) aus *Didymocarpus leucocalyx* (Gesneriaceae) isoliert und identifiziert werden konnten. Bisher wurde kein Nachweis von

Rosmarinsäure oder Chlorogensäure in Gesneriaceae berichtet. Wir konnten in den untersuchten Arten (*Phinea multiflora*, *Streptocarpus caulescens*, *Streptocarpus rexii*) ebenfalls keine Rosmarinsäure oder Chlorogensäure finden (Tabelle 8).

3.3.2.3.3. Familie Lamiaceae

Rosmarinsäure wurde als Reinsubstanz zum ersten Mal aus *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) isoliert (Scarpati und Oriente, 1958). Dann wurde nachgewiesen, dass Rosmarinsäure verbreitet in der Familie Lamiaceae vorkommt, jedoch nur in der Unterfamilie Nepetoideae (Litvinenko et al., 1975). Die Familie Lamiaceae wurde aufgrund verschiedener molekularer Untersuchungen von Wagstaff et al. (1998) basierend auf der Analyse von *rbcL*- und *ndhF*-Sequenzdaten in die sieben folgenden Unterfamilien gegliedert: Teucrioideae, Viticoideae, Scutellarioideae, Lamioideae, Pogostemonoideae, Chloanthoideae und Nepetoideae. Rosmarinsäure ist ein charakteristischer Stoff der Nepetoideae, denn diese Substanz wurde in 110 von insgesamt 127 Arten der Lamiaceae, die alle zu den Nepetoideae gehören, nachgewiesen (Pedersen, 2000). Allerdings fand Pedersen (2000) Rosmarinsäure auch in zwei Arten (*Aegiphila mollis*, *Teucrium scorodonia*) der Unterfamilie Teucrioideae und einer Art (*Hymenopyramis brachiata*) mit unklarer Unterfamilien Zuordnung. Chlorogensäure hingegen wurde nur in 34 Arten gefunden. Diese Arten gehören zu den folgenden Unterfamilien: Lamioideae, Nepetoideae (Tribus Lavanduleae, Elsholzieae und Ocimeae) sowie selten in den Teucrioideae und Viticoideae (Pedersen, 2000).

Die neueste Klassifizierung nach Olmstead (2005) erkennt nur noch fünf Unterfamilien der Lamiaceae: Teucrioideae, Scutellarioideae, Prostantheroideae, Nepetoideae und Viticoideae. Diese Einteilung wurde in Tabelle 8 angewandt.

Tabelle 8: Rosmarinsäure- und Chlorogensäure-Konzentrationen in den Blättern von verschiedenen Arten der Lamiaceae. Die Konzentrationen wurden mit HPLC bestimmt und die Identität der Substanzen mit DC bestätigt (M: Marburg, TG = Trockengewicht); Zuordnung zu Unterfamilien der Familie Lamiaceae: Nep = Nepetoideae, Scu = Scutellarioideae (nach Olmstead, 2005).

Familie	Art	Her- kunft	Rosmarinsäure		Chlorogensäure	
			% des Blatt-TG		% des Blatt-TG	
			HPLC	DC	HPLC	DC
Lamiales						
Acanthaceae	<i>Acanthus hungaricus</i>	M	-	-	-	-
	<i>Acanthus longifolius</i>	M	-	-	-	-
	<i>Barleria micans</i>	M	-		0,03 ± 0,007	+
	<i>Jacobinia zelandia</i>	M	-		-	
	<i>Odontonema schomburgkianum</i>	M	-		-	
Gesneriaceae	<i>Phinea multiflora</i>	M	0,075 *		-	
	<i>Streptocarpus caulescens</i>	M	-	-	-	-
	<i>Streptocarpus rexii</i>	M	-		-	
Lamiaceae	<i>Calamintha nepeta</i> (Nep)	M	0,68 ± 0,04	+	-	-
	<i>Collinsonia canadensis</i> (2006) (Nep)	M	15,50 ± 0,5	+	-	-
	<i>Collinsonia canadensis</i> (2007) (Nep)	M	8,20 ± 0,25		-	
	<i>Dracocephalum spec.</i> (Nep)	M	0,06 ± 0,01	+	3,43 ± 0,05	+
	<i>Glechoma hederacea</i> (2006) (Nep)	M	0,12 ± 0,01	+	0,08 ± 0,001	+
	<i>Glechoma hederacea</i> (2007) (Nep)	M	0,36 ± 0,04		0,90 ± 0,06	+
	<i>Lavandula angustifolia</i> (Nep)	M	0,60 ± 0,03		-	-
	<i>Lavandula multifida</i> (Nep)	M	0,55 ± 0,04	+	-	-
	<i>Leonurus cardiaca</i> (Scu)	M	-	-	0,11 ± 0,03	+
	<i>Marrubium vulgare</i> (Scu)	M	-	-	-	
	<i>Melissa officinalis</i> (Nep)	M	3,80 ± 0,80	+	-	
	<i>Mentha aquatica</i> (Nep)	M	8,65 ± 0,25	+	-	
	<i>Micromeria thymifolia</i> (Nep)	M	6,20 ± 0,40	+	-	
	<i>Origanum majorana</i> (Nep)	M	7,70 ± 0,01	+	-	
	<i>Phlomis tuberosa</i> (Scu)	M	-	-	4,60 ± 0,05	+
	<i>Plectranthus ciliatus</i> (Nep)	M	5,18 ± 0,05	+	-	-
	<i>Salvia officinalis</i> (Nep)	M	8,67 ± 0,03	+	-	-
	<i>Salvia splendens</i> (Nep)	M	2,28 ± 0,16	+	-	
	<i>Satureja montana</i> (Nep)	M	5,10 ± 0,01	+	-	

Grayer et al. (2003) berichteten das Vorkommen von zwei neuen phenolischen Naturstoffen, Nepetoidin A und B (Abbildung 32), in Lamiaceae-Arten als spezifische Inhaltsstoffe, die die Nepetoideae von den anderen Unterfamilien der Lamiaceae unterscheidet. Beide Substanzen kommen nur in den Nepetoideae vor und weder in den anderen Unterfamilien der Lamiaceae noch in den nahe verwandten Familien wie Verbenaceae, Scrophulariaceae und Acanthaceae. Außerdem unterscheidet auch das Vorkommen von Kaffeesäureestern die Nepetoideae von ihren Verwandten. Manche wichtigen chemotaxonomischen Eigenschaften wie die Bildung von Rosmarinsäure sind nicht immer auf die Nepetoideae begrenzt, sondern kommen auch in den anderen Unterfamilien vor.

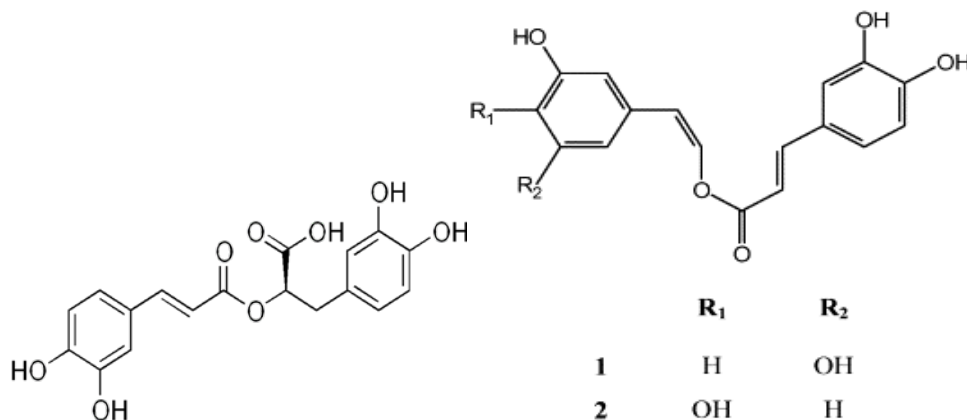


Abb. 32 Struktur von Rosmarinsäure sowie Nepetoidin A (1) und Nepetoidin B (2).

In den Nepetiodinen fehlt die Carboxylgruppe der Hydroxyphenyllactateinheit, außerdem treten auch andere Substitutionsmuster in der Hydroxyphenyllactateinheit auf. Die in dieser Arbeit untersuchten Gattungen (Tabelle 8) gehören zwei Unterfamilien der Lamiaceae an (nach Olmstead, 2005):

Scutellarioideae: *Leonurus*, *Marrubium*, *Phlomis*

Nepetoideae: *Calamintha*, *Dracocephalum*, *Glechoma*, *Lavandula*, *Melissa*, *Mentha*, *Micromeria*, *Origanum*, *Salvia*, *Satureja*, *Plectranthus*, *Collinsonia*

Unsere Ergebnissen zeigen eindeutig, dass Rosmarinsäure in Scutellarioideae (*Leonurus cardiaca*, *Marrubium vulgare*, *Phlomis tuberosa*) nicht vorkommt. Auf der anderen Seite kommt Rosmarinsäure in allen untersuchten Arten der Nepetoideae vor: *Calamintha nepeta* (Abb. 33), *Collinsonia canadensis* (Abb. 34), *Dracocephalum spec.* (Abb. 35), *Glechoma hederacea* (Abb. 36), *Lavandula angustifolia* (Abb. 37),

Lavandula multifida (Abb. 38), Melissa officinalis (Abb. 39), Mentha aquatica (Abb. 40), Micromeria thymifolia (Abb. 41), Origanum majorana (Abb. 42), Plectranthus ciliatus (Abb. 43), Salvia officinalis (Abb. 44), Salvia splendens (Abb. 45) und Satureja montana (Abb. 46). Mit Blick auf die Rosmarinsäurekonzentrationen in den verschiedenen Arten ist zu bemerken, dass die höchsten Rosmarinsäuregehalte in *Collinsonia canadensis* (15,50%) vorkommt. Dies war die größte Menge in allen untersuchten Arten der verschiedenen Familien und Ordnungen in dieser Untersuchung. An zweiter Stelle kommen *Salvia officinalis* (8,67%) und *Mentha aquatica* (8,65%), gefolgt von *Origanum majorana* (7,70%). In diesen vier Arten wurde jedoch keine Chlorogensäure gefunden. Das Vorkommen von Chlorogensäure ist von der Zugehörigkeit zu Unterfamilien unabhängig, da Chlorogensäure in *Dracocephalum spec.*, *Glechoma hederacea*, *Leonurus cardiaca* und *Phlomis tuberosa* nachweisbar war (siehe Tabelle 8).

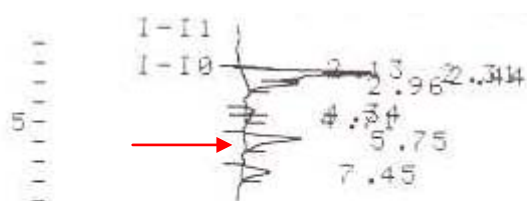


Abb. 33: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Calamintha nepeta* Der rote Pfeil deutet auf den Peak für Rosmarinsäure. Retentionzeit von Rosmarinsäure: 5,75.



Abb. 34: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Collinsonia canadensis* Der blaue Pfeil deutet auf den Peak für Rosmarinsäure. Retentionzeit von Rosmarinsäure: 6,22.

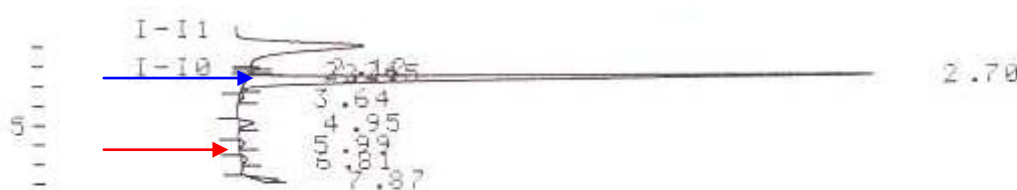


Abb. 35: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Dracocephalum spec.* Der blaue Pfeil deutet auf den Peak für Chlorogensäure, der rote auf Rosmarinsäure. Retentionzeit von Rosmarinsäure: 5,99 und von Chlorogensäure: 2,70.

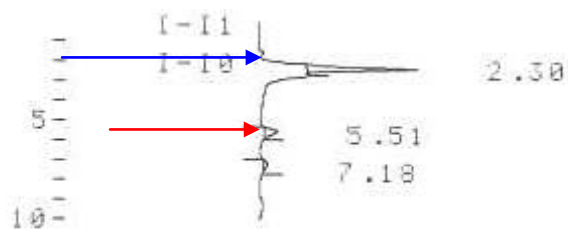


Abb. 36: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Glechoma hederacea* Der blaue Pfeil deutet auf den Peak für Chlorogensäure, der rote auf Rosmarinsäure. Retentionzeit von Rosmarinsäure: 5,51 und von Chlorogensäure: 2,30.

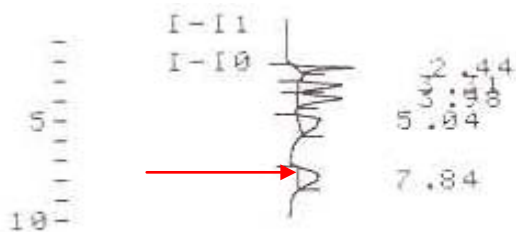


Abb. 37: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Lavandula angustifolia* Der rote Pfeil deutet auf den Peak für Rosmarinsäure. Retentionzeit von Rosmarinsäure: 7,84.



Abb. 38: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Lavandula multifida*. Der rote Pfeil deutet auf den Peak für Rosmarinsäure. Retentionzeit von Rosmarinsäure: 6,03.

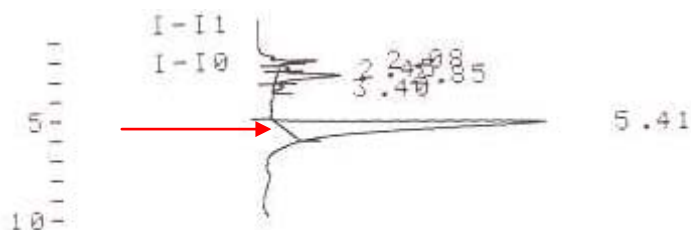


Abb. 39: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Melissa officinalis*. Der rote Pfeil deutet auf den Peak für Rosmarinsäure. Retentionzeit von Rosmarinsäure: 5,41.

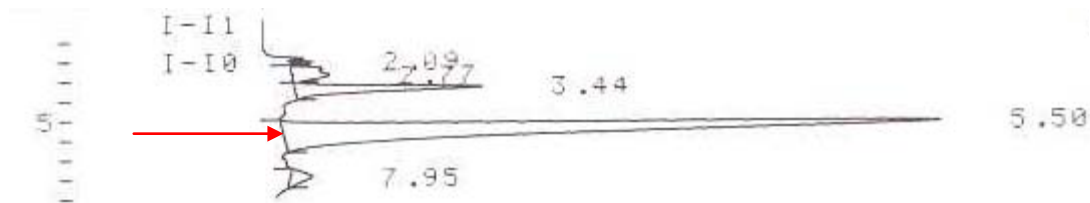


Abb. 40: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Mentha aquatica*. Der rote Pfeil deutet auf den Peak für Rosmarinsäure. Retentionzeit von Rosmarinsäure: 5,50.

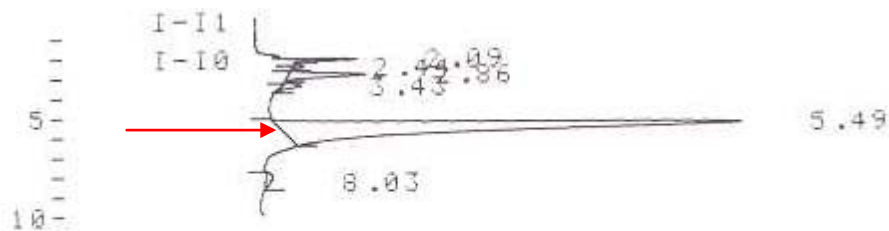


Abb. 41: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Micromeria thymifolia*. Der blaue Pfeil deutet auf den Peak für Rosmarinsäure. Retentionzeit von Rosmarinsäure: 5,49.

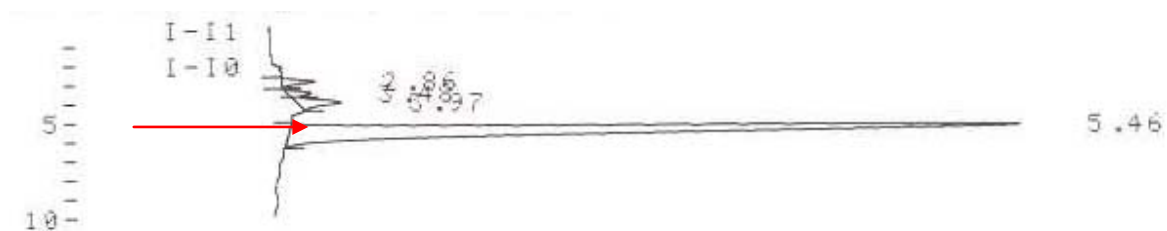


Abb. 42: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Origanum majorana*. Der rote Pfeil deutet auf den Peak für Rosmarinsäure. Retentionzeit von Rosmarinsäure: 5,46.

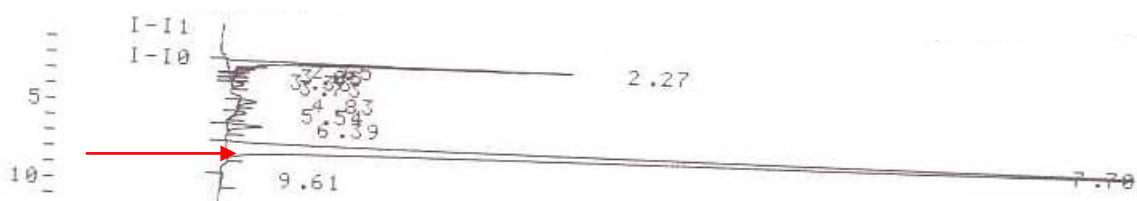


Abb. 43: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Plectranthus ciliatus*. Der rote Pfeil deutet auf den Peak für Rosmarinsäure. Retentionzeit von Rosmarinsäure: 7,70.

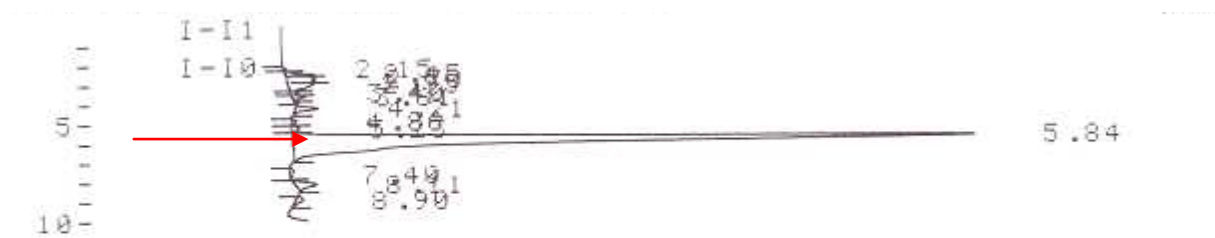


Abb. 44: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Salvia officinalis*. Der rote Pfeil deutet auf den Peak für Rosmarinsäure. Retentionzeit von Rosmarinsäure: 5,84.

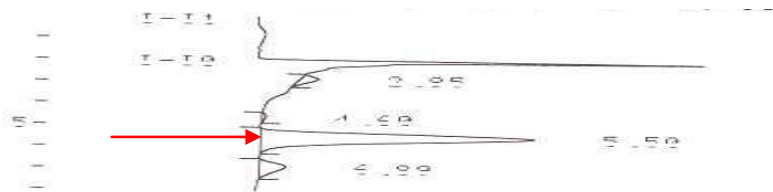


Abb. 45: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Salvia splendens*. Der blaue Pfeil deutet auf den Peak für Rosmarinsäure. Retentionzeit von Rosmarinsäure: 5,59.

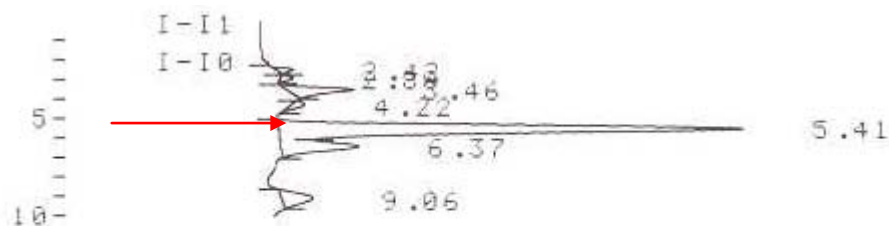


Abb. 46: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Satureja montana*. Der blaue Pfeil deutet auf den Peak für Rosmarinsäure. Retentionzeit von Rosmarinsäure: 5,41.

3.3.2.3.4. Familie Oleaceae

In den Oleaceae wurden verschiedene Flavonoide in den Blättern gefunden, deren Hauptkomponente neben Kämpferolglycosiden und Quercetin Ligustalosid A ist. Von Romani et al. (2000) und hier in dieser Studie wurde *Olea europaea* untersucht. Weder Rosmarinsäure noch Chlorogensäure wurden in den Blättern gefunden (Tabelle 9).

Tabelle 9: Rosmarinsäure- und Chlorogensäure-Konzentrationen in den Blättern von verschiedenen Arten der Oleaceae, Plantaginaceae, Scrophulariaceae und Verbenaceae. Die Konzentrationen wurden mit HPLC bestimmt und die Identität der Substanzen mit DC bestätigt (M: Marburg, TG = Trockengewicht, * = Spuren).

Familie	Art	Her- kunft	Rosmarinsäure		Chlorogensäure	
			% des Blatt-TG		% des Blatt-TG	
			HPLC	DC	HPLC	DC
Oleaceae	<i>Olea europaea</i>	M	-		-	
Plantagina- ceae	<i>Digitalis lanata</i>	M	-	-	-	-
	<i>Digitalis lutea</i>	M	-	-	-	-
	<i>Plantago media</i>	M	-	-	0,28 ± 0,03	+
	<i>Plantago nivalis</i>	M	-	-	-	-
	<i>Plantago schwarzenbergiana</i>	M	-	-	-	-
	<i>Plantago sempervirens</i>	M	-	-	0,23 ± 0,03	+
Scrophula- riaceae	<i>Calceolaria scabiosifolia</i>	M	-	-	0,36 ± 0,27	+
	<i>Chelone lyonii</i>	M	-	-	0,13 ± 0,01	+
	<i>Linaria triornithophora</i>	M	-	-	-	-
	<i>Nemesia strumosa</i>	M	-	-	-	-
	<i>Penstemon digitalis</i>	M	-	-	0,35 ± 0,01	+
	<i>Penstemon hirsuta</i>	M	-	-	-	-
	<i>Penstemon serrulatus</i>	M	-	-	-	-
	<i>Scrophularia nodosa</i>	M	-	-	-	-
	<i>Verbascum phlomoides</i> (130 mg)	M	0,01 *		-	
	<i>Verbascum undulatum</i>	M	-	-	-	-
	<i>Veronica longifolia</i>	M	-	-	-	-
Verbena- ceae	<i>Lantana camara</i>	M	(0,08) *	-	-	
	<i>Verbena Kultivare</i>	M	-		-	-
	<i>Verbena officinalis</i> (2006)	M	-	-	-	-
	<i>Verbena officinalis</i> (2007)	M	-		-	
	<i>Verbena rigida</i>	M	-		-	
	<i>Verbena urticifolia</i>	M	-	-	-	-

3.3.2.3.5. Familie Plantaginaceae

Rosmarinsäure wurde früher in Plantaginaceae entdeckt (Holzmannova, 1995; Petersen und Simmonds, 2003), aber in den in der vorliegenden Studie untersuchten Arten (*Digitalis lanata*, *Digitalis lutea*, *Plantago media*, *Plantago nivalis*, *Plantago schwarzenbergiana*, *Plantago sempervirens*) konnte keine Rosmarinsäure gefunden

werden, und nur in *Plantago media* und *Plantago sempervirens* war Chlorogensäure nachweisbar (Tabelle 9).

3.3.2.3.6. Familie Scrophulariaceae

Fernandez et al. (1995) berichteten das Vorkommen von Rosmarinsäure in *Scrophularia scorodonia* (Scrophulariaceae). Später berichteten Krishnan et al. (1999), dass Chlorogensäure und Kaffeesäure in *Limnophila aromatica* (Scrophulariaceae) vorkommen. Im Vergleich mit unseren Ergebnisse zeigt sich, dass Chlorogensäure in einigen Arten der Scrophulariaceae eindeutig enthalten ist (*Calceolaria scabiosifolia*, *Chelone lyonii*, *Penstemon digitalis*), aber in anderen Arten nicht vorkommt (*Linaria triornithophora*, *Nemesia strumosa*, *Penstemon hirsuta*, *Penstemon serrulatus*, *Scrophularia nodosa*, *Verbascum phlomoides*, *Verbascum undulatum*, *Veronica longifolia*). In keiner der untersuchten Arten konnte Rosmarinsäure nachgewiesen werden (Tabelle 9).

3.3.2.3.7. Familie Verbenaceae

Im Jahr 2000 wurde bestätigt, dass Chlorogensäure in manchen *Vitex*-Arten (Verbenaceae) vorkommt (Pedersen 2000).

In den hier untersuchten Arten der Verbenaceae (*Lantana camara*, *Verbena spec.*, *Verbena officinalis*, *Verbena rigida*, *Verbena urticifolia*) konnten weder Chlorogensäure noch Rosmarinsäure nachgewiesen werden (siehe Tabelle 9). Renée et al. (1999) verglichen die chemosystematischen Beziehungen zwischen den Pflanzenfamilien der Asteridae mit den Beziehungen, die sich durch Analyse der *rbcl* Sequenzen ergaben. Diese Untersuchungen haben bestätigt, dass es eine größere Verwandtschaft zwischen Scrophulariaceae und Lamiaceae als zwischen Scrophulariaceae und Solanaceae gibt. Die in Hegnauers Schriftenreihe "Chemotaxonomie der Pflanzen" (1962 - heute) dargestellte Ansicht über die natürliche Verwandtschaft der zu den Asteridae s. l. gehörenden Pflanzenfamilien auf der Grundlage von chemischen Profilen wird mit den Ergebnissen kladistischer Analysen von DNA-Sequenzen des *rbcl*-Gens in diesen Familien verglichen. Die auf chemischen Ergebnissen basierende Annahme, dass die Cornaceae nicht eng mit den Apiaceae und Araliaceae verwandt sind, wird durch molekularbiologische Befunde unterstützt. Daraus lässt sich folgern, dass die Apiaceae und die Araliaceae

stattdessen näher mit den Asteraceae verwandt sind. Ebenso wird eine nahe Verwandtschaft zwischen den Scrophulariaceae und den Lamiaceae einerseits und zwischen den Solanaceae und den Boraginaceae andererseits bestätigt, anstelle der oft vertretenen herkömmlichen Ansicht einer engen Verbindung zwischen den Scrophulariaceae und Solanaceae sowie zwischen den Lamiaceae und Boraginaceae.

Cantino et al. (1992) gliederten mehrere Gattung der früheren Verbenaceae in die Familie der Lamiaceae ein. Aus diesem Grund war eigentlich zu erwarten, dass Rosmarinsäure in Verbenaceae zu finden sein sollte, da Lamiaceae und Verbenaceae nah verwandt sind und Rosmarinsäure oft in Lamiales vorkommt. Rosmarinsäure ist demnach kein chemotaxonomischer Marker so wie Molgaard und Ravn (1988) für Kaffeesäurederivate postuliert haben.

3.3.2.4. Ordnung Solanales

3.3.2.4.1. Familie Convolvulaceae

Tabelle 10: Rosmarinsäure- und Chlorogensäure-Konzentrationen in den Blättern von verschiedenen Arten der Convolvulaceae und Solanaceae Die Konzentrationen wurden mit HPLC bestimmt und die Identität der Substanzen mit DC bestätigt (M: Marburg, TG = Trockengewicht).

Familie	Art	Her- kunft	Rosmarinsäure		Chlorogensäure	
			% des Blatt-TG		% des Blatt-TG	
			HPLC	DC	HPLC	DC
Solanales						
Convolvulaceae	<i>Convolvulus tricolor</i>	M	-	-	0,75 ± 0,09	+
Solanaceae	<i>Atropa belladonna</i> (2007)	M	-	-	1,99 ± 0,15	+
	<i>Atropa belladonna</i> (2007)		-	-	1,04 ± 0,10	+
	<i>Datura stramonium</i>	M	-	-	-	-
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	M	-	-	0,82 ± 0,17	+
	<i>Nicotiana sylvestris</i>	M	-	-	1,73 ± 0,07	+
	<i>Physalis alkekengi</i>	M	-	-	-	-
	<i>Saracha edulis</i>	M	-	-	-	-
	<i>Withania somnifera</i>	M	-	-	0,99 ± 0,12	+

Liu et al. (2007) berichteten, dass Chlorogensäure in *Erycibe obtusifolia* (Convolvulaceae) existiert. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wird das Vorkommen von Chlorogensäure in Convolvulaceae bestätigt, da Chlorogensäure in *Convolvulus tricolor* gefunden wurde (siehe Tabelle 10).

3.3.2.4.2. Familie Solanaceae

Molgaard und Ravn (1988) postulierten, dass Chlorogensäure generell in Solanaceae vorkommt. Dies kann durch die vorliegenden Ergebnisse nur zum Teil bestätigt werden, da Chlorogensäure in *Atropa belladonna*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana sylvestris* und *Withania somnifera* enthalten ist, aber nicht in allen Arten nachgewiesen wurde. Sie fehlte in *Datura stramonium*, *Physalis alkekengi* und *Saracha edulis*. In keiner der genannten Arten wurde Rosmarinsäure gefunden (siehe Tabelle 10). Niggeweg et al. (2004) berichteten ebenfalls, dass Chlorogensäure generell in Solanaceae vorkommt, und bezeichneten Chlorogensäure als die am besten lösliche phenolische Substanz in *Solanum lycopersicum* (syn. *Lycopersicon esculentum*).

Unter Berücksichtigung der oben genannten Hypothese, dass eine engere Beziehung zwischen Solanaceae und Boraginaceae als zwischen Scrophulariaceae und Solanaceae besteht (Renée et al., 1999), wäre zu erwarten, dass Rosmarinsäure auch in Solanaceae vorkommt, dies wurde bis jetzt jedoch noch nicht nachgewiesen.

3.3.3. Euasteriden II

3.3.3.1. Ordnung Apiales

3.3.3.1.1. Familie Apiaceae

Hiller (1965) konnte Rosmarinsäure und Chlorogensäure aus *Sanicula europaea* isolieren. Später berichteten Lamaison et al. (1990), dass Rosmarinsäure in hohen Konzentrationen in den Boraginaceae, Lamiaceae und Apiaceae (*Sanicula*-Arten) vorkommt. In der vorliegenden Studie wurde in *Sanicula marilandica* keine Rosmarinsäure nachgewiesen.

Parejo et al. (2004) bestimmten den Gehalt an phenolischen Naturstoffen in *Foeniculum vulgare*. Sie konnten mehrere Phenole und zusätzlich Rosmarinsäure, Chlorogensäure und Rutin nachweisen. Die höchsten Konzentrationen an Phenolen wurden mit 3,05 g/100 g in Fenchel-Destillationsrückständen (ganze Pflanzen) gefunden. Der Gehalt an Rosmarinsäure in diesem Material lag bei knapp 0,5% des Trockengewichts; Chlorogensäure und Rutin wurden mit 0,2% und 0,04% bestimmt. Es traten jedoch auch mehrere weitere Mono- und DicaFFEoylchinasäureester auf. Es ist interessant, dass in unseren Untersuchungen zwar Chlorogensäure mit Gehalten von 0,68% bis 2,00% des Trockengewichts in Fenchel-Blattmaterial gefunden wurde, Rosmarinsäure jedoch nicht.

In der vorliegenden Studie wurde Rosmarinsäure nur in *Astrantia major* (Abb. 47) identifiziert (Tabelle 11). In den anderen untersuchten Arten der Apiaceae (*Anthriscus cerefolium*, *Anthriscus sylvestris*, *Apium graveolens*, *Carum carvi*, *Cenolophium denudatum*, *Dorema ammoniacum*, *Eryngium bourgatii*, *Foeniculum vulgare*, *Levisticum officinale*, *Ligusticum scoticum*, *Peucedanum officinale*, *Sanicula marilandica*, *Seseli hippomarathrum*, *Seseli libanotis*) konnte keine Rosmarinsäure gefunden werden.

Chlorogensäure kommt in den Apiaceae oft vor, und zwar in allen oben genannten Arten außer *Ligusticum scoticum*, *Sanicula marilandica*, *Seseli hippomarathrum* und *Seseli libanotis* (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Rosmarinsäure- und Chlorogensäure-Konzentrationen in den Blättern von verschiedenen Arten der Apiaceae, Araliaceae, Aquifoliaceae, Asteraceae und Menyanthaceae. Die Konzentrationen wurden mit HPLC bestimmt und die Identität der Substanzen mit DC bestätigt (M: Marburg, TG = Trockengewicht, * = Spuren).

Familie	Art	Her- kunft	Rosmarinsäure		Chlorogensäure	
			% des Blatt-TG		% des Blatt-TG	
			HPLC	DC	HPLC	DC
Apiales						
Apiaceae	<i>Anthriscus cerefolium</i>	M	-	-	0,19 ± 0,02	+
	<i>Anthriscus sylvestris</i>	M	-	-	2,50 ± 0,10	+
	<i>Apium graveolens</i>	M	-	-	1,17 ± 0,03	+
	<i>Astrantia major</i> (2006)	M	0,27 ± 0,03	+	3,21 ± 0,05	+
	<i>Astrantia major</i> (2007)	M	0,78 ± 0,07		3,14 ± 0,16	
	<i>Carum carvi</i>	M	-	-	0,58 ± 0,12	+
	<i>Cenolophium denudatum</i>	M	-	-	0,98 ± 0,04	+
	<i>Dorema ammoniacum</i>	M	-	-	1,10 ± 0,10	+
	<i>Eryngium bourgatii</i>	M	-	-	2,10 ± 0,15	+
	<i>Foeniculum vulgare</i>	M	-	-	0,68 ± 0,02	+

	(2006)					
	<i>Foeniculum vulgare</i> (2007)	M	-		2,00 ± 0,12	
	<i>Levisticum officinale</i>	M	-	-	1,96 ± 0,04	+
	<i>Ligusticum scoticum</i>	M	-	-	1,23 ± 0,17	-
	<i>Peucedanum officinale</i>	M	-	-	1,71 ± 0,02	+
	<i>Sanicula marilandica</i>	M	-		0,57 ± 0,23	-
	<i>Seseli hippomarathrum</i>	M	-	-	0,18 ± 0,01	-
	<i>Seseli libanotis</i>	M	-	-	-	-
Araliaceae	<i>Aralia californica</i>	M	-	-	2,75 ± 0,02	+
	<i>Eleutherococcus senticosus</i>	M	0,05 *		1,16 ± 0,14	+
	<i>Hedera colchica</i>	M	-	-	1,75 ± 0,05	+
	<i>Hedera helix</i> (2006)	M	-	-	0,16 ± 0,04	+
	<i>Hedera helix</i> (2007)	M	-		2,69 ± 0,21	
Aquifoliales						
Aquifolia- Ceae	<i>Ilex aquifolium</i>	M	-	-	0,91 ± 0,01	+
Asterales						
Asteraceae	<i>Achillea millefolium</i>	M	-	-	3,50 ± 0,20	+
	<i>Arnica chamissonis</i>	M	-	-	0,47 ± 0,05	+
	<i>Centaurea macrocephala</i> (2007)	M	-	-	0,05 ± 0,005	+
	<i>Centaurea macrocephala</i> (2007)	M	-		1,40 ± 0,07	
	<i>Cichorium intybus</i>	M	-	-	2,69 ± 0,18	+
	<i>Helianthus annuus</i>	M	-	-	1,29 ± 0,02	+
	<i>Tagetes tenuifolia</i>	M	-	-	-	-
Menyantha- ceae	<i>Menyanthes trifoliata</i>	M	-	-	3,50 ± 0,14	+

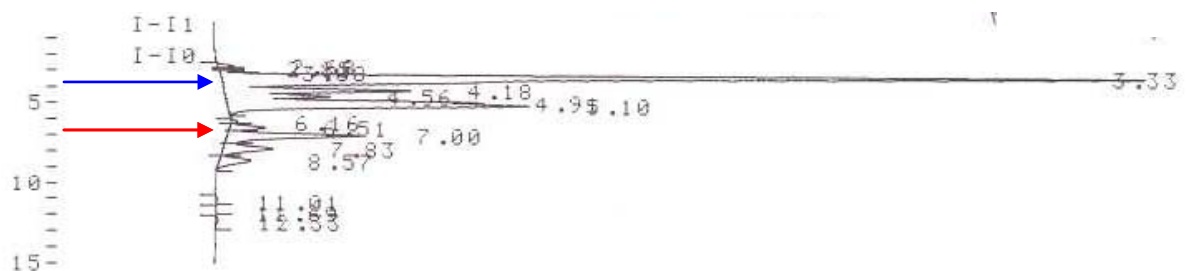


Abb. 47: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Astrantia major*. Der blaue Pfeil deutet auf den Peak für Chlorogensäure, der rote auf Rosmarinsäure. Retentionszeit von Rosmarinsäure: 7,00 und von Chlorogensäure: 3,33.

3.3.3.1.2. Familie Araliaceae

Trute und Nahrstedt (1996, 1997) berichteten das Vorkommen von Rosmarinsäure in *Hedera helix* aus der Familie Araliaceae. Sie isolierten und identifizierten die Rosmarinsäure mit drei verschiedenen Analysemethoden (HPLC, Kapillarelektrophorese, Gaschromatographie) sowie mit NMR. Der Rosmarinsäuregehalt war sehr niedrig bei 0,0022% des Drogentrockengewichts.

Außerdem isolierten sie weitere phenolische Verbindungen aus *Hedera helix*, sowie Rutin und Chlorogensäure. Die wurden jeweils mit HPLC und Kapillarelektrophorese bestimmt. Chlorogensäure (1,17% und 1,12% des Trockenextrakts (DEV 6:1)) entspricht (0,195% und 0,186% des Drogentrockengewichts) und Rutin (1,72% und 1,62% des Trockenextrakts (DEV 6:1)) entspricht (0,286% und 0,27% des Drogentrockengewichts). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen allerdings nicht das Vorkommen von Rosmarinsäure in Araliaceae-Arten. Dies könnte in dem sehr geringen Gehalt begründet sein. Nur Chlorogensäure konnte in allen untersuchten Arten nachgewiesen werden (*Aralia californica*, *Eleutherococcus senticosus*, *Hedera colchica*, *Hedera helix*) (Tabelle 11).

3.3.3.2. Ordnung Aquifoliales

3.3.3.2.1. Familie Aquifoliaceae

Clifford und Ramirez-Martinez (1990) haben zum ersten Mal Chlorogensäure in *Ilex* gefunden und gemessen. Dies wird durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt: *Ilex aquifolium* produziert Chlorogensäure, aber keine Rosmarinsäure (Tabelle 11). Später berichteten Prediger et al. (2008) Rutin und Kämpferol in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae).

3.3.3.3. Ordnung Asterales

3.3.3.3.1. Familie Asteraceae

Grayer et al. (1999) hatten die Beziehungen zwischen den Familien aufgrund der molekularen Eigenschaften *rbcL* Gene bestimmt und vertraten die Theorie, dass die

Asteraceae sehr nah mit den Apiaceae und Araliaceae verwandt sind, anstelle einer festen Beziehung zwischen Cornaceae und Apiaceae sowie Araliaceae auf der anderen Seite.

Martino et al. (1979) konnten zum ersten Mal Isochlorogensäure (Gemisch aus 3,4-, 4,5- und 3,5-Dicaffeoylchinasäure) aus *Pluchea sagittalis* (Asteraceae) isolieren.

Rubio et al. (1992) wies Rosmarinsäure in *Scolymus hispanicus* L. aus der Familie der Asteraceae nach. Dann isolierten Falleh et al. (2008) 15 Phenole aus *Cynara cardunculus* (Asteraceae), darunter Rosmarinsäure, Chlorogensäure und Quercetin. Die Zuordnung erfolgte hier allerdings nur aufgrund der Retentionszeiten bei der HPLC-Analyse eines Gesamtextrakts und ist dementsprechend mit Vorsicht zu betrachten. Der gesamte Gehalt an Phenolen betrug 7-14,8 mg Gallussäure-äquivalente g⁻¹ TG.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen das Vorkommen von Chlorogensäure in Asteraceae-Arten. Zwar bildet eine der untersuchten Arten keine Chlorogensäure (*Tagetes tenuifolia*), die anderen Arten (*Achillea millefolium*, *Arnica chamissonis*, *Centaurea macrocephala*, *Cichorium intybus*, *Helianthus annuus*) zeigten jedoch positive Ergebnisse (Tabelle 11). Rosmarinsäure wurde in keiner Art der Asteraceae gefunden.

3.3.3.3.2. Familie Menyanthaceae

In Blättern von *Menyanthes trifoliata* wurden Flavonole und Chlorogensäure nachgewiesen (Swiatek, 1986 zitiert in Martz et al., 2009). In der vorliegenden Studie wurde das Vorkommen von Chlorogensäure in *Menyanthes trifolia* bestätigt, aber Rosmarinsäure konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 11).

Flavonoidderivate wie Rutin und Hyperosid sind ebenfalls in Menyanthaceae bekannt (Mel'chakova und Kharitonova, 1976).

3.3.3.4. Ordnung Dipsacales

3.3.3.4.1. Familie Caprifoliaceae

In *Lonicera japonica* wurden mehrere bioaktive Naturstoffe gefunden, z. B. Chlorogensäure, Flavonoide und Iridoidglycoside (Xing et al., 2001 zitiert in Chai et

al., 2005). Auch in *Viburnum opulus* L. wurden Chlorogensäure, Rutinoside und Quercetin nachgewiesen (Velioglu et al., 2006).

In der vorliegenden Studie wurden zehn Arten der Caprifoliaceae untersucht: *Diervilla lonicera*, *Diervilla trifolia*, *Lonicera demissa*, *Lonicera emphyllocalyx*, *Lonicera ferdinandii*, *Lonicera kamtschatica*, *Lonicera syringantha*, *Viburnum dilatatum*, *Viburnum hupehense* und *Viburnum lantana*. In keiner Art wurde Rosmarinsäure identifiziert, aber Chlorogensäure wurde in allen Arten außer in *Lonicera syringantha* nachgewiesen (siehe Tabelle 12).

3.3.3.4.2. Familie Dipsacaceae

In den Dipsacaceae wurde Chlorogensäure in *Cephalaria abrosioides* zum ersten Mal identifiziert (Pasi et al. 2002). In anderen Studien wurden ebenfalls Chlorogensäure und andere Phenolsäuren in verschiedenen *Scabiosa*-Arten gefunden (Zemtsova et al., 1972).

Das Vorkommen von Chlorogensäure wird durch die vorliegende Arbeit bestätigt. Hier wurden sechs Arten der Dipsacaceae untersucht, in fünf davon (*Dipsacus laciniatus*, *Knautia dipsacifolia*, *Scabiosa atropurpurea*, *Scabiosa caucasica*, *Scabiosa inflexa*) konnte Chlorogensäure nachgewiesen werden, und nur in *Cephalaria gigantia* wurde keine Chlorogensäure gefunden (Tabelle 12).

Das Vorkommen von Rosmarinsäure in Dipsacaceae konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachvollzogen werden. Im Jahr 1996 hatte Kowalczyk (zitiert in Petersen et al., 2009) aus *Knautia arvensis* Rosmarinsäure isoliert, was in den vorliegenden Untersuchungen jedoch nicht erfolgte.

Tabelle 12: Rosmarinsäure- und Chlorogensäure-Konzentrationen in den Blättern von verschiedenen Arten der Caprifoliaceae und Dipsacaceae. Die Konzentrationen wurden mit HPLC bestimmt und die Identität der Substanzen mit DC bestätigt (M: Marburg, TG = Trockengewicht).

Familie	Art	Her- kunft	Rosmarinsäure		Chlorogensäure	
			% des Blatt-TG		% des Blatt-TG	
			HPLC	DC	HPLC	DC
Dipsacales						
Caprifoliaceae	<i>Diervilla lonicera</i>	M	-	-	9,40 ± 0,30	+
	<i>Diervilla trifolia</i>	M	-	-	1,00 ± 0,12	+
	<i>Lonicera demissa</i>	M	-	-	2,98 ± 0,28	+
	<i>Lonicera emphylocalyx</i>	M	-	-	1,40 ± 0,01	+
	<i>Lonicera ferдинandii</i>	M	-	-	8,20 ± 0,62	+
	<i>Lonicera kamtschatica</i>	M	-	-	1,38 ± 0,12	+
	<i>Lonicera syringantha</i>	M	-	-	-	-
	<i>Viburnum dilatatum</i>	M	-	-	1,90 ± 0,09	+
	<i>Viburnum hupehense</i>	M	-	-	1,69 ± 0,11	+
	<i>Viburnum lantana</i> (2007)	M	-	-	2,45 ± 0,02	+
	<i>Viburnum lantana</i> (2007)	M	-		1,34 ± 0,14	
Dipsacaceae	<i>Cephalaria gigantia</i>	M	-	-	-	-
	<i>Dipsacus laciniatus</i> (2007)	M	-	-	0,87 ± 0,05	+
	<i>Dipsacus laciniatus</i> (2007)	M	-		4,50 ± 0,40	
	<i>Knautia dipsacifolia</i>	M	-	-	4,75 ± 0,14	+
	<i>Scabiosa atropurpurea</i>	M	-	-	3,92 ± 0,08	+
	<i>Scabiosa caucasica</i>	M	-	-	2,18 ± 0,09	+
	<i>Succisella inflexa</i> (2007)	M	-	-	2,26 ± 0,01	+
	<i>Succisella inflexa</i> (2007)	M	-		2,60 ± 0,30	+

3.3.4. Rosiden

3.3.4.1. Ordnung Geraniales

3.3.4.1.1. Familie Geraniaceae

Chlorogensäure wurde bei den Geraniaceae erstmals in Blättern von *Pelargonium zonale* nachgewiesen (Popescu et al., 2004). Zuvor hatte Bate-Smith (1973) zehn verschiedene Arten von *Pelargonium* (Geraniaceae) analysiert und dabei

herausgefunden, dass die Arten generell verschiedene Flavonoide enthalten sowie hohe Konzentrationen von Myricetin, Proanthocyanidinen und Quercetin.

Tabelle 13: Rosmarinsäure- und Chlorogensäure-Konzentrationen in den Blättern von verschiedenen Arten der Geraniaceae, Lythraceae und Onagraceae. Die Konzentrationen wurden mit HPLC bestimmt und die Identität der Substanzen mit DC bestätigt (M: Marburg, TG = Trockengewicht)

Familie	Art	Her- kunft	Rosmarinsäure		Chlorogensäure	
			% des Blatt-TG		% des Blatt-TG	
			HPLC	DC	HPLC	DC
Geraniales						
Geraniaceae	<i>Erodium manescavii</i>	M	-		-	
	<i>Geranium sanguineum</i>	M	-		-	
	<i>Geranium watense</i>	M	-		-	
	<i>Geranium sylvaticum</i>	M	-	-	0,69 ± 0,11	+
Myrtales						
Lythraceae	<i>Cuphea procumbens</i>	M	-		-	
	<i>Lythrum alatum</i>	M	-	-	-	-
	<i>Lythrum hyssopifolium</i>	M	-	-	-	-
Onagraceae	<i>Gaura biennis</i> (2007)	M	-	-	-	-
	<i>Gaura biennis</i> (2007)	M	-		-	
	<i>Oenothera missouriensis</i>	M	-		-	-
	<i>Lopezia racemosa</i>	M	-		-	-

In der vorliegenden Studie wurden vier Arten untersucht (*Erodium manescavii*, *Geranium sanguineum*, *Geranium watense*, *Geranium sylvaticum*). Bei *Geranium sylvaticum* konnte Chlorogensäure nachgewiesen werden (Tabelle 13). Rosmarinsäure wurde in keiner der genannten Arten gefunden.

3.3.4.2. Ordnung Myrtales

3.3.4.2.1. Familie Lythraceae

Mehrere Flavone und Anthocyane wurden aus *Lythrum salicaria* (Lythraceae) isoliert und bestimmt (Paris, 1967). In der vorliegenden Studie konnten in den untersuchten Arten *Cuphea procumbens*, *Lythrum alatum*, *Lythrum hyssopifolium* weder Chlorogensäure noch Rosmarinsäure nachgewiesen werden (Tabelle 13).

3.3.4.2.2. Familie Onagraceae

Mehrere Flavonole wurden in *Epilobium angustifolium* (Onagraceae) gefunden (Ducrey et al., 1995). In den hier untersuchten Arten (*Gaura biennis*, *Oenothera missouriensis*, *Lopezia racemosa*) konnte jedoch weder Chlorogensäure noch Rosmarinsäure gefunden werden (Tabelle 13), obwohl Huang et al. (2007) Rosmarinsäure in *Jussiaea repens* nachweisen konnten.

3.3.5. Eurosiden I

3.3.5.1. Ordnung Celastrales

3.3.5.1.1. Familie Celastraceae

Tabelle 14: Rosmarinsäure- und Chlorogensäure-Konzentrationen in den Blättern von verschiedenen Arten der Celastraceae, Cucurbitaceae und Hydrangeaceae. Die Konzentrationen wurden mit HPLC bestimmt und die Identität der Substanzen mit DC bestätigt (M: Marburg, TG = Trockengewicht)

Familie	Art	Her- kunft	Rosmarinsäure		Chlorogensäure	
			% des Blatt-TG		% des Blatt-TG	
			HPLC	DC	HPLC	DC
Celastrales						
Celastraceae	<i>Euonymus verrucosus</i>	M	-		-	
Cucurbitales						
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita spec.</i>	M	-	-	-	-
	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>Giromontiina</i>	M	-		-	-
	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>Oleifera</i>	M	-		-	-
Rosales						
Hydrangeaceae	<i>Philadelphus spec.</i>	M	-	-	0,49 ± 0,03	+

Ly et al. (2006) konnte acht phenolische Substanzen aus *Celastrus hindsii* Benth (Celastraceae) isolieren und identifizieren, der Hauptbestandteil war Rosmarinsäure. In der vorliegenden Studie wurde *Euonymus verrucosus* untersucht, dabei wurden weder Chlorogensäure noch Rosmarinsäure gefunden (siehe Tabelle 14).

3.3.5.2. Ordnung Cucurbitales

3.3.5.2.1. Familie Cucurbitaceae

In Cucurbitaceae (*Momordica balsamina*) wurde Rosmarinsäure gefunden (De Tommasi et al., 1991), und im Jahr 2004 konnten Cai et al. auch Flavonole (Rutin) identifizieren. In der vorliegenden Arbeit konnte in *Cucurbita*-Arten weder Chlorogensäure noch Rosmarinsäure identifiziert werden (Tabelle 14).

3.3.5.3. Ordnung Rosales

Bei den Rosaceae (Ordnung Rosales) berichteten Hossain et al. (2009) von Rosmarinsäure in *Malus sylvestris* (Apfel).

3.3.5.3.1. Familie Hydrangeaceae

Takeda et al. (1985) berichtete das Vorkommen von Chlorogensäure in *Hydrangea macrophylla* (Hydrangeaceae). In der vorliegenden Studie konnten wir Chlorogensäure, aber keine Rosmarinsäure in *Philadelphus* nachweisen (siehe Tabelle 14).

3.3.6. Eurosiden II

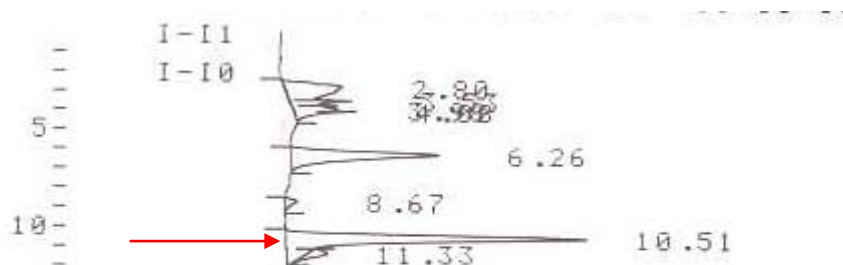


Abb. 48: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Helicteres jamaicens*. Der rote Pfeil deutet auf den Peak für Rosmarinsäure. Retentionzeit von Rosmarinsäure:10,51.

Tabelle 15: Rosmarinsäure- und Chlorogensäure-Konzentrationen in den Blättern von verschiedenen Arten der Malvaceae und Thymelaeaceae. Die Konzentrationen wurden mit HPLC bestimmt und die Identität der Substanzen mit DC bestätigt (M: Marburg, TG = Trockengewicht, * = Spuren).

Familie	Art	Her- kunft	Rosmarinsäure		Chlorogensäure	
			% des Blatt-TG		% des Blatt-TG	
			HPLC	DC	HPLC	DC
Malvales						
Malvaceae	<i>Abutilon theophrastis</i>	M	0,009 *		-	
	<i>Abutilon theophrastis</i>	M	-	-	-	-
	<i>Alcea rosea</i>	M	-		-	
	<i>Alyogyne huegelii</i>	M	0,01 *		-	
	<i>Callirhoe involucrata</i>	M	-		-	
	<i>Helicteres jamaicensis</i>	M	1,15 ± 0,05	+	-	
	<i>Hibiscus cannabinus</i>	M	-		-	
	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	M	-		-	
	<i>Lavatera trimestris</i>	M	-		-	
	<i>Malope trifida</i>	M	-		-	
	<i>Pavonia gledhillii</i>	M	-		-	
Frühere Sterculiaceae	<i>Abroma augustum</i>	M	-		-	
	<i>Dombeya rotundifolia</i>	M	0,16 ± 0,01	-	-	
	<i>Theobroma cacao</i>	M	-	-	-	-
	<i>Theobroma cacao</i>	M	-	-	0,13 ± 0,01	+
	<i>Theobroma cacao</i>	M	-	-	0,6 ± 0,005	+
Frühere Tiliaceae	<i>Tilia americana</i>	M	-		-	
	<i>Tilia amurensis</i> (2006)	M	-	-	-	-
	<i>Tilia amurensis</i> (2007)	M	-		-	
	<i>Tilia cordata</i>	M	-	-	0,04 ± 0,001	+
	<i>Tilia japonica</i>	M	-	-	0,02 ± 0,002	+
	<i>Tilia platyphyllos</i>	M	-	-	0,02 ± 0,003	+
	<i>Tilia tomentosa</i>	M	-	-	-	-
Thymelaeae- ceae	<i>Daphne mezereum</i>	M	-		-	

3.3.6.1. Ordnung Malvales

3.3.6.1.1. Familie Malvaceae

Die früher eigenständigen Familien der Tiliaceae und der Sterculiaceae wurde neuerdings den Malvaceae zugeordnet.

Chlorogensäure, Kaffeesäure und Rutin wurden in *Theobroma cacao* L. gefunden (Griffiths, 1958), später wurden auch Hydroxyzimtsäureamide in *Theobroma cacao* L. nachgewiesen (Alemanno et al., 2003).

Rosmarinsäure und Isorinsäure (Abb. 49) wurden in *Helicteres isora* L. (Sterculiaceae) nachgewiesen (Satake et al., 1999), die Isorinsäure ist ein Ester aus Kaffeesäure und 4-Hydroxyphenylmilchsäure und damit eine Vorstufe der Rosmarinsäure.

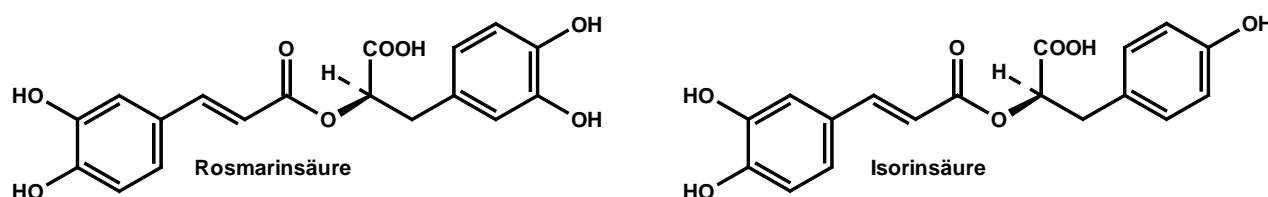


Abb. 49: Strukturen von Rosmarinsäure und Isorinsäure.

In der vorliegenden Studie wurde das Vorkommen von Rosmarinsäure in *Helicteres jamaicensis* (Abb. 48) bestätigt (Tabelle 15), wogegen in den anderen untersuchten Arten der Malvaceae (*Abutilon theophrastis*, *Alcea rosea*, *Alyogyne huegelii*, *Callirhoe involucrata*, *Hibiscus cannabinus*, *Hibiscus rosa-sinensis*, *Lavatera trimestris*, *Malope trifida*, *Pavonia gledhillii*) weder Chlorogensäure noch Rosmarinsäure nachgewiesen werden konnten.

In dieser Studie konnte nur Chlorogensäure, jedoch keine Rosmarinsäure in *Theobroma cacao* identifiziert werden (Tabelle 15) und bei den anderen Arten *Abroma augustum* und *Dombeya rotundifolia* keine dieser Substanzen.

Rosmarinsäure konnte in den früheren Tiliaceae nachgewiesen werden (*Apeiba tibourbou*, *Triumfetta bartramia*) (Lasure et al., 1994; Ho et al., 1995). Im Jahr 2004 haben Sterbova et al. Lindenblüten (*Tilia cordata*) analysiert und die extrahierten phenolischen Stoffe identifiziert. Dies waren unter anderem Gallussäure (14,20 µg/g TG), Vanillinsäure (6,78 µg/g TG), Kaffeesäure (5,92 µg/g TG) und Rosmarinsäure (6,50 µg/g TG). Chlorogensäure wurde in *Tilia cordata* nicht gefunden. Das steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, denn hier wurden sechs *Tilia*-Arten untersucht (*Tilia americana*, *Tilia amurensis*, *Tilia cordata*, *Tilia japonica*, *Tilia platyphyllos*, *Tilia tomentosa*), in denen Rosmarinsäure nicht nachgewiesen

werden konnte. Chlorogensäure war in geringen Konzentrationen in *Tilia cordata* (im Gegensatz zu Sterbova et al., 2004), *Tilia japonica* und *Tilia platyphyllos* enthalten (siehe Tabelle 15).

3.3.6.1.2. Familie Thymelaeaceae

Cumarine wurden in *Daphne giraldii* der Familie Thymelaeaceae (Wang und Gaugaz, 1980) gefunden, später wurden Biflavonoide in *Daphne giraldii* nachgewiesen (Zhou et al., 2002).

In der vorliegenden Studie konnte weder Chlorogensäure noch Rosmarinsäure in *Daphne mezereum* gefunden werden (Tabelle 15).

3.4. Zur Diskussion: Rosmarinsäure, Chlorogensäure als chemotaxonomische Marker im Pflanzenreich?

Die Rosmarinsäure wurde in der Familie der Anthocerotaceae (Hornmoose) gefunden, auch in der Ordnung Polypodiales (Farne) konnte Rosmarinsäure aus der Familie Blechnaceae isoliert werden. In den basalen Ordnungen kommt die Rosmarinsäure ebenfalls selten vor, hier ist sie bis jetzt nur in Chloranthales (Magnoliiden) bekannt. In Monokotyledonen wurde die Rosmarinsäure häufig nachgewiesen (Alismatales, Liliales, Poales und Zingiberales). Weiterhin wurde die Rosmarinsäure in den höheren Pflanzenordnungen der Eudikotyledonen (Rosiden und Asteriden) sehr oft gefunden. In der Familie der Boraginaceae kommt die Rosmarinsäure durchgehend vor. Auffällig ist, dass das Vorkommen von Rosmarinsäure in den basalen Gruppen der Eudikotyledonen bisher noch nicht bekannt ist (siehe Abbildung 50).

Die Chlorogensäure kommt im Pflanzenreich häufiger vor als Rosmarinsäure. In den Blechnaceae (Farnen) ist die Chlorogensäure oft nachweisbar, aber wenig in den basalen Ordnungen und Monokotyledonen (hier meistens zusammen mit Rosmarinsäure). Ebenso wie die Rosmarinsäure wurde die Chlorogensäure in den basalen Gruppen der Eudikotyledonen bisher nicht nachgewiesen, aber in den Kern-Eudikotyledonen kommt sie oft vor, insbesondere in Asteriden. Beispielsweise wurde Chlorogensäure in fast allen untersuchten Pflanzenarten der Dipsacales

nachgewiesen (siehe Abbildung 50). Diese Ergebnisse, die in Abb. 50 vorgestellt sind, basieren zum größten Teil auf den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Ordnungen. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass Chlorogensäure und Rosmarinsäure auch in Ordnungen, die hier nicht untersucht wurden, vorkommen.

Im Rahmen dieser Studie wurden die Rosmarinsäure und Chlorogensäure enthaltenden Pflanzenarten aus der vorliegenden Arbeit nicht unbedingt als nahe verwandte Familien oder Ordnungen eingeordnet. Rosmarinsäure war zum Beispiel in den Blechnaceae nur in zwei Gattungen zu finden und ist auch nicht in allen Arten von *Blechnum* vorhanden. In beiden untersuchten Arten der *Canna* wurden Rosmarinsäure und Chlorogensäure entdeckt, und trotz der nahen Verwandtschaft zwischen Cannaceae und Marantaceae wird diesem Befund eine geringe Aussagekraft zugemessen, da die Rosmarinsäure nur aus zwei Gattungen mit drei Arten isoliert werden konnte und aus den anderen Arten der Familie Marantaceae überhaupt nicht.

Es ist bekannt, dass die Rosmarinsäure in den Boraginaceae überall vorkommt. Dies wurde in der vorliegenden Studie bestätigt. Dabei war auffällig, dass der Gehalt von Chlorogensäure in den Pflanzen, die Rosmarinsäure in großen Konzentrationen enthalten, meistens sehr gering war. Dasselbe traf auch bei den Lamiaceae zu.

Weiterhin wurde RA lange Zeit für einen charakteristischen Stoff der Unterfamilie Nepetoideae gehalten. Dies wird in den vorliegenden Untersuchungen gestützt. Ein Fehlen der Rosmarinsäure trat nur bei Arten aus anderen Unterfamilien auf. Pedersen (2000) beschrieb dagegen das Vorkommen von Rosmarinsäure auch vereinzelt in Arten anderer Unterfamilien. Bei den Apiaceae wurde Rosmarinsäure nur aus einer Art isoliert, wobei die Chlorogensäure sehr oft in der Familie zu finden ist. In den Malvaceae wurde schon vor langer Zeit RA nachgewiesen, dies wurde durch die vorliegende Studie bestätigt (siehe Abb. 50).

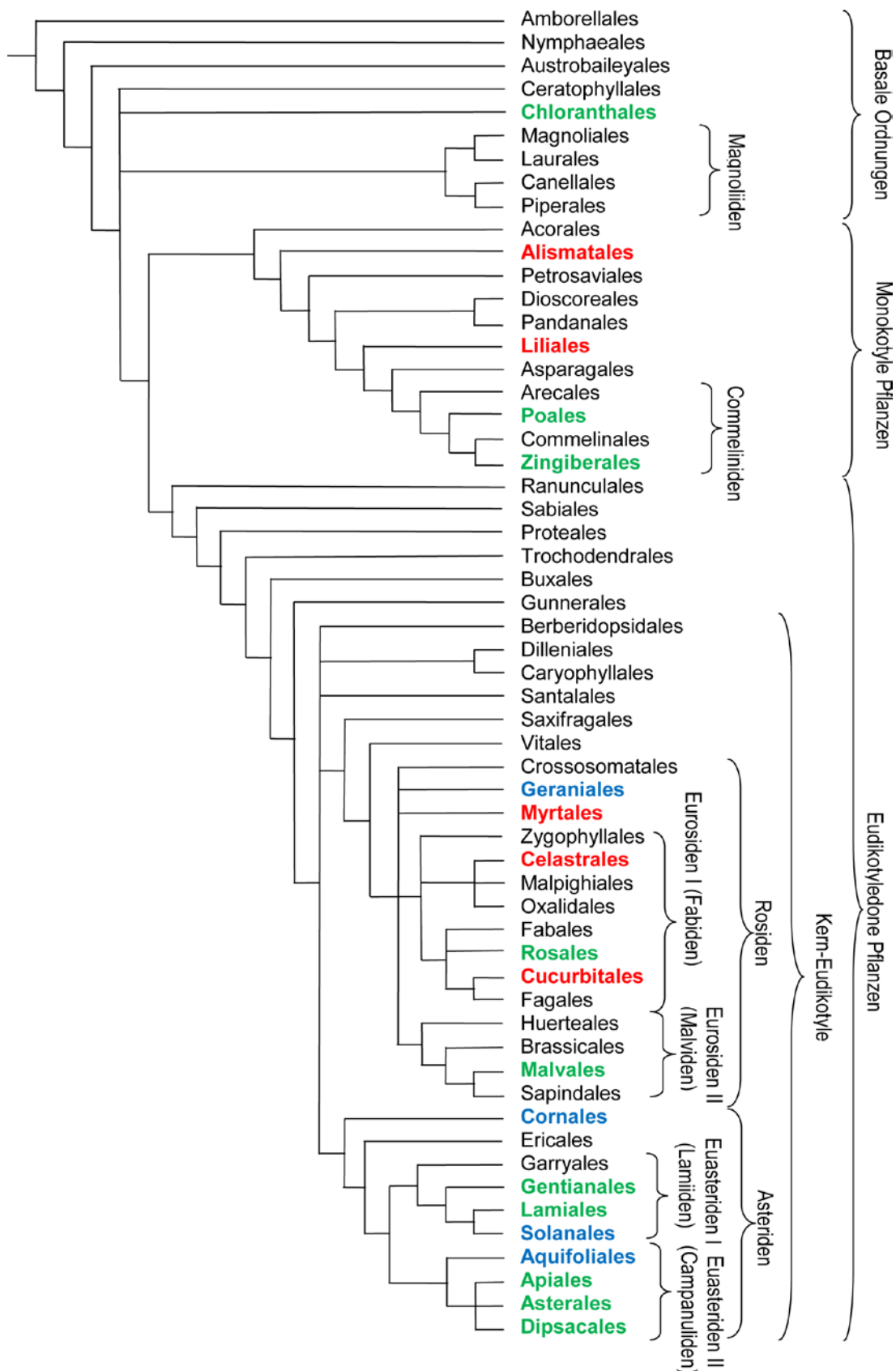


Abb. 50: Klassifikation der Angiospermen (nach Bresinsky et al., 2008). Ordnungen mit Vertretern, die nur Rosmarinsäure enthalten, sind **rot**, Ordnungen mit Vertretern, die nur Chlorogensäure enthalten, sind **blau** und Ordnungen mit Vertretern, die beide Kaffeesäureester enthalten, sind **grün** geschrieben.

Die phylogenetischen Untersuchungen basieren sowohl auf morphologischen als auch auf molekularbiologischen Daten. In diesem Zusammenhang war interessant, ob Rosmarin- und Chlorogensäure als chemotaxonomischer Marker brauchbar sei: Rosmarinsäure und Chlorogensäure können nicht für die chemotaxonomische Klassifizierung der verschiedenen Familien und Ordnungen eingesetzt werden, weil das Vorkommen einer bestimmten Verbindung sogar innerhalb einer Gattung nicht einheitlich ist. Grayer et al. (2003) kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Rosmarinsäure keine chemotaxonomischen Eigenschaften bei den Lamiaceae hat.

3.5. Das Vorkommen von Naturstoffen in *in-vitro*-Kulturen von Arten der Zingiberaceae

3.5.1. Ergebnisse

3.5.1.1. *Curcuma xanthorrhiza* und *Curcuma longa* (Kurkuma, Gelbwurzel)

Die Hauptwirkstoffe in *Curcuma spec.* sind die drei Curcuminoide, die schon lange in Gewürzen (Curry) und als bioaktive Wirkstoffe bekannt sind (siehe Einleitung). Wegen dieser wichtigen biologischen Eigenschaften der Curcuminoide ist ihre Biosynthese von großem Interesse. Sie wurde von Ramirez-Ahumada et al. (2006) auf Enzymebene untersucht.

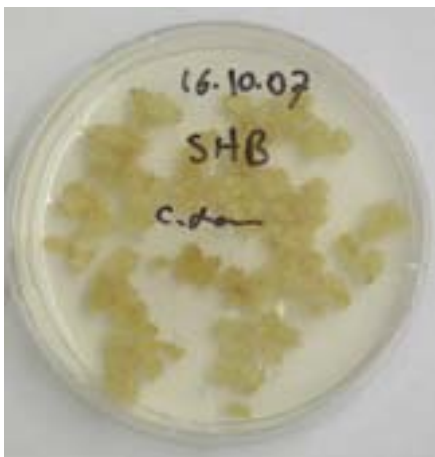


Abb. 51: Kalluskulturen aus *Curcuma xanthorrhiza* angelegt auf SHB Nährmedium.

Als Basis für mögliche weiter gehende Untersuchungen zur Biosynthese der Curcuminoide wurden in der vorliegenden Arbeit Zellkulturen von zwei *Curcuma*-

Arten angelegt (Abbildung 51), vermehrt und dann mit HPLC und DC auf Curcuminoiden hin untersucht.

Beide Zellkulturarten (Kallus- und Wurzelkulturen) zeigten leider kein Auftreten von Curcuminoiden. Deshalb wurde getestet, ob Elicitierung einen Einfluss auf die Biosynthese der Wirkstoffe hat. Suspensionskulturen wurden angelegt und mit Methyljasmonat (Endkonzentration 100 µM) und Ethanol (als Kontrolle) behandelt. Drei bis vier Tage nach der Zugabe wurden die Kulturen aufgearbeitet und analysiert, jedoch waren auch in diesem Fall keine Curcuminoiden nachweisbar. Shirgurkar et al. (2001) hatten Mikrorhizome von *Curcuma longa* *in vitro* produziert. Durch einen Farbtest (Färbung mit 0,1 N NaOH pink, mit 0,1 N HCl gelb) konnten sie Curcuminoiden in diesen differenzierten Strukturen nachweisen. Auch unsere Zellaggregate von *Curcuma longa* färbten sich entsprechend an. Trotzdem konnten in Zellextrakten über HPLC keine Curcuminoiden nachgewiesen werden

In einem weiteren Versuch wurden "Hairy Root"-Kulturen von *Curcuma xanthorrhiza* angelegt. Dafür wurden die Blätter von *Curcuma xanthorrhiza* zusammen mit den *Agrobacterium rhizogenes*-Stämmen LBA9402, LBA15834 und TR105 kultiviert. Eine Ausbildung von Wurzeln konnte jedoch nicht beobachtet werden.

3.5.1.2. *Zingiber officinale*



Abb. 52: Kalluskulturen aus *Zingiber officinale* angelegt auf SHB Nährmedium.



Abb. 53: Kallus- und Wurzelkulturen aus *Zingiber officinale* angelegt auf MS Nährmedium.

Die Hauptwirkstoffe in *Zingiber officinale* sind die Gingerole, vor allem 6-Gingerol und 8-Gingerol. Diese kommen am häufigsten im Rhizom vor.

Gingerole sind wegen ihrer wichtigen biologischen und medizinischen Anwendungen bekannt (siehe Einleitung). Die Biosynthese der Gingerole wird seit mehr als 25

Jahren untersucht (Denniff und Whiting 1976). Aus Interesse an der Biosynthese der Gingerole suchten wir nach Gingerolen in *in-vitro*-Kulturen von *Zingiber officinale*. Genauso wie bei *Curcuma* wurden Kalluskulturen von *Zingiber officinale* angelegt (Abbildung 52), vermehrt, und dann mit HPLC und DC analysiert. Es konnten keine Gingerole nachgewiesen werden. Auch nachdem die Konzentration an hinzugefügten Phytohormonen geändert wurde und Wurzeln aus dem Kallus herauswuchsen (Abbildung 53), zeigten sich keine positiven Ergebnisse. Auch hier wurde die Möglichkeit der Elicitierung getestet, jedoch konnte keine Gingerolbildung beobachtet werden. Anschließend wurden hier ebenfalls "Hairy Root"-Kulturen angelegt. Trotz der Behandlung mit *Agrobacterium rhizogenes* wuchsen keine Wurzeln aus den Blättern heraus, es zeigte sich also keine Reaktion.

3.5.2. Diskussion

Früher ging man davon aus, dass *Agrobacterium* meistens nur zweikeimblättrige Pflanzen infizieren kann. Neue Studien haben jedoch festgestellt, dass manche einkeimblättrige Pflanzen ebenfalls empfänglich für Agrobakterien sind. Raineri et al. (1993) infizierten *Zea mays* und andere Arten der Gramineae mit *Agrobacterium rhizogenes*. Im Rahmen der Agroinfektion konnten sie beweisen, dass diese Agrobakterien fähig sind, virale DNA (maize streak virus, MSV) in die Zellen von *Zea mays* zu transportieren. Lee et al. (2001) beschrieben die morphologischen Änderungen in *Oryza sativa* (Reis) durch die Transformation mit dem *rolA*-Gen der T-DNA des Ri-Plasmids von *Agrobacterium rhizogenes*. Sie beobachteten verschiedene morphologische Änderungen wie Kallus- und Wurzelbildung auf der Blattoberfläche. Auch an *Curcuma*-Arten wurden bereits Versuche mit *Agrobacterium tumefaciens* durchgeführt. Mahadtanapuk et al. (2006) publizierten ein Protokoll für die genetische Transformation und Regeneration von *Curcuma alismatifolia*. Sie konnten dabei Sprossbildung auslösen und ganze Pflanzen regenerieren.

Mehrere Studien haben gezeigt, dass auch Transport und Expression der T-DNA durch *Agrobacterium tumefaciens* in mehreren Familien der Monokotyledonen auftritt, und zwar in Liliaceae (Hernalsteens et al., 1984), in Iridaceae (Graves und Goldman, 1986) und in Typhaceae (Nandakumar et al., 2005).

Bis jetzt wurde Wurzelbildung in Monokotyledonen durch Infektion mit *A. rhizogenes* noch in keiner Studie nachgewiesen, und auch in der vorliegenden Arbeit ist dies mit *Curcuma* und *Zingiber* nicht gelungen.

Die Zellkulturen von *Curcuma* und *Zingiber* wurden kontinuierlich überimpft und weiter auf dem gleichen Nährmedien kultiviert. Später wurden die Kulturen mit einem anderen Nährmedium getestet und auf die angesprochenen Naturstoffe hin regelmäßig analysiert. Trotz allem konnten keine Curcuminoide und keine Gingerole nachgewiesen werden.

Yasuda et al. haben bereits 1987 Kalluskulturen von *Curcuma zedoria* untersucht (siehe Einleitung 1.5.4.), Der Kallus produzierte kein Cineol, aber die Gewebekultur-Pflanzen haben Cineol gebildet. Shirgurkar et al. (2001) hatten Mikrorhizome von *Curcuma longa in vitro* erhalten und in denen Curcuminoide nachgewiesen. Das bedeutet, dass differenzierte Organe gebraucht wurden, um die Sekundärstoffbildung anzuregen. Bisher gibt es keine Studien, die das Vorkommen von Curcuminoiden oder Gingerolen in Kalluskulturen bestätigen.

4. Zusammenfassung

4.1. Vorkommen von Rosmarinsäure und Chlorogensäure im Pflanzenreich:

Rosmarinsäure (RA) und Chlorogensäure (CA) sind Kaffeesäureester. Sie sind im Pflanzenreich weit verbreitet, vermutlich als Abwehrstoffe. In der vorliegenden Studie wurden mehr als 240 Pflanzenarten zum Nachweis von Rosmarinsäure und Chlorogensäure untersucht. Mehrere Rosmarinsäure-enthaltende Arten wurden (neu) entdeckt. Das Auftreten von Rosmarinsäure in der Familie Marantaceae war bislang unbekannt. Rosmarinsäure wurde bereits in Hornmoosen nachgewiesen, in Farnen (Familie Blechnaceae) und in einzelnen Arten aus verschiedenen Ordnungen der Monokotyledonen (Alismatales, Liliales, Poales, Zingiberales) sowie in Rosiden und Asteriden der Eudikotyledonen (Myrtales, Celastrales, Rosales, Cucurbitales, Malvales, Gentianales, Lamiales, Apiales, Asterales, Dipsacales). Von den Basalen Ordnungen ist bisher erst ein Vorkommen von Rosmarinsäure in der Gattung *Chloranthus* (Chloranthaceae, Chloranthales) beschrieben worden. Ebenso wurde auch die Chlorogensäure in Arten ganz verschiedener Familien und Ordnungen nachgewiesen, in Monokotyledonen seltener.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten RA- und CA-enthaltenden Pflanzenarten zeigen zum Teil nur geringe Verwandtschaft als nahe verwandte Familien oder Ordnungen. In der vorliegenden Studie war RA nur in zwei Arten der Familie Blechnaceae nachweisbar (*Blechnum brasiliense* und *B. gibbum*), wogegen sie in anderen Arten von *Blechnum* nicht vorhanden war. Hingegen wurde CA in vielen Arten der Blechnaceae gefunden.

In beiden untersuchten Arten von *Canna* wurden RA und CA entdeckt. Innerhalb der Familie der Marantaceae konnte RA nur aus *Maranta leuconeura*, *Maranta depressa* und *Thalia geniculata* isoliert werden und war weder in den anderen zwei *Maranta*-Arten noch in den anderen sieben Gattungen der Familie Marantaceae nachweisbar. Das Vorkommen von CA und RA in den Marantaceae war unabhängig voneinander. Rutin wurde auch in Zingiberales nachgewiesen, und zwar in Arten der Cannaceae, Lowiaceae, Marantaceae und Strelitziaceae.

Von den Boraginaceae ist bekannt, dass RA überall vorkommt. Dies wurde in der vorliegenden Studie bestätigt. Dabei war auffällig, dass der Gehalt von CA in den Pflanzen, die RA in großen Konzentrationen enthalten, meistens sehr gering war.

Dasselbe galt auch für die Lamiaceae. In *Collinsonia canadensis* wurde die größte Rosmarinsäure-Konzentration aller untersuchter RA-enthaltenden Pflanzenarten (15,50% des TG) nachgewiesen. RA wurde lange Zeit für charakteristisch für die Unterfamilie Nepetoideae gehalten; dies wurde mit den hier dargestellten Untersuchungen unterstützt. In Apiaceae wurde RA nur aus *Astrantia major* isoliert, wogegen CA sehr oft in dieser Familie zu finden war. In den Malvaceae wurde schon vor einiger Zeit RA nachgewiesen, dies wurde durch die vorliegende Studie bestätigt. CA kommt davon unabhängig in der Familie vor.

Auffällig ist, dass Chlorogensäure im Pflanzenreich weiter verbreitet ist als Rosmarinsäure, da Chlorogensäure in vielen Familien und Ordnungen nachgewiesen wurde, in denen keine Rosmarinsäure gefunden werden konnte.

Publizierte phylogenetische Stammbäume basieren sowohl auf morphologischen als auch auf molekularbiologischen Daten. In diesem Zusammenhang wurde die Frage untersucht, ob Rosmarin- und Chlorogensäure als chemotaxonomische Marker gelten können. Dies kann eindeutig verneint werden, da beide Verbindungen weit über das Pflanzenreich verbreitet vorkommen und das Auftreten selbst bei verschiedenen Arten einer Gattung oder verschiedenen Gattungen einer Familie bzw. verschiedenen Familien einer Ordnung nicht einheitlich ist.

4.2. Das Vorkommen von Naturstoffen in *In-vitro*-Kulturen von Arten der Zingiberaceae:

Kalluskulturen wurden von *Curcuma xanthorrhiza*, *Curcuma longa* und *Zingiber officinale* auf verschiedenen Nährmedien angelegt. Die Kalluskulturen wurden analysiert und auf das Vorkommen von Curcuminoiden und Gingerolen gesucht. Zusätzlich wurde versucht, durch Infektion mit *Agrobacterium rhizogenes* Wurzelkulturen zu erlangen. Von den Kalluskulturen wurden Suspensionkulturen angelegt und diese mit Methyljasmonat eliciert. In allen Versuchen konnten jedoch keine Gingerole oder Curcuminoiden nachgewiesen werden.

5. Summary

5.1. Occurrence of rosmarinic acid and chlorogenic acid in the plant kingdom:

Rosmarinic acid (RA) and chlorogenic acid (CA) are caffeic acid esters. They are widespread in the plant kingdom and presumably serve as defense substances. In the present study, more than 240 plant species have been examined for the occurrence of rosmarinic acid and chlorogenic acid. Several rosmarinic acid-containing species were detected. The presence of rosmarinic acid within the family Marantaceae was not known before. Rosmarinic acid has already been detected in hornworts, in ferns of the family Blechnaceae and in different species within the orders of the monocotyledonous plants (Alismatales, Liliales, Poales, Zingiberales) as well as in the rosids and asterids of the eudicotyledonous plants (Myrtales, Celastrales, Rosales, Cucurbitales, Malvales, Gentianales, Lamiales, Apiales, Asterales, Dipsacales). Only one proof of RA has been reported of the basal orders in the genus *Chlorantus* (Chloranthaceae, Chloranthales). Similarly, chlorogenic acid has also been detected in very different families and orders, however to a lesser extent in monocots.

In this study, the RA- and CA-containing species from the present work were not necessarily classified as closely related families or orders. In the present study, RA was detected only in two species of the family Blechnaceae (*Blechnum brasiliense* and *B. gibbum*), but not in the other species of *Blechnum*, whereas CA was often found in the Blechnaceae.

RA and CA were discovered in both the examined species of *Canna*. Within the family Marantaceae, RA could be isolated only from *Maranta leuconeura*, *Maranta depressa* and *Thalia geniculata*, and neither from any other of the four investigated species of *Maranta* nor from one of the seven additionally analyzed other genera of the family Marantaceae. The presence of CA and of RA was totally independent in the Marantaceae. Rutin has also been detected in Zingiberales, namely in Cannaceae, Lowiaceae, Marantaceae and Strelitziaceae.

It is known that RA occurs throughout the Boraginaceae, which was confirmed in the present study, but it is interesting that the content of CA in the plants that contain high concentrations of RA was usually very low. The same applied to the Lamiaceae.

Collinsonia canadensis contained the highest concentration of rosmarinic acid of all investigated RA-containing plant species (15.50% of the DW). Furthermore, for a long time RA was considered to be a characteristic compound of the subfamily Nepetoideae, which was supported by the present study. In Apiaceae, RA was isolated only from *Astrantia major*, whereas CA was found frequently in this family. In the Malvaceae, RA has previously been demonstrated and the present study confirmed this result. The occurrence of CA is totally independent in the family.

It is striking that chlorogenic acid is more widespread in the plant kingdom than rosmarinic acid, since chlorogenic acid has been demonstrated in many families and orders in which rosmarinic acid has not been found.

Phylogenetic studies are based on morphological and on molecular data, and it was interesting to find out whether RA and CA could be considered as chemotaxonomic markers: It becomes obvious that RA and CA are not suitable as chemotaxonomic markers since the compounds occur widely in the plant kingdom and are not consistent in different species of an order or different genera of a family or different families of an order.

5.2. The occurrence of natural compounds in *in vitro* cultures of species of the Zingiberaceae:

Callus cultures were established from *Curcuma xanthorrhiza*, *Curcuma longa* and *Zingiber officinale* on various growth media. The callus cultures were analyzed and examined for the presence of curcuminoids and gingerols. In addition, plant material was infected with *Agrobacterium rhizogenes* in order to achieve hairy root cultures. On the other hand, suspension cultures were established from the cell cultures and elicited with methyl jasmonate. All tests have shown negative results, gingerols or curcuminoids have not been detected.

Literaturverzeichnis

Abdullah, Y., Schneider, B., Petersen, M., (2008): Occurrence of rosmarinic acid, chlorogenic acid and rutin in Marantaceae species. *Phytochemistry* 1(4), 199-203.

Adesina, S.K., Harborne, J.B., (1978): The occurrence and identification of flavonoids in *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Planta Med.* 34, 323-327.

Adinolfi, M., Corsaro, M.M., Lanzetta, R., Mancino, A., Mangoni, L., Parrilli, M., (1993): Triterpenoid oligoglycosides from *Chionodoxa luciliae*. *Phytochemistry* 34(3), 773-778.

Afifi, M.S., (2003): A novel 4'-O-diglycoside of decarboxyrosmarinic acid from *Blepharis ciliaris*. *Pharm. Biol.* 41(7), 487-490.

APG III (2009): An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.* 61, 105-121.

Al-Amin, Z.M., Thomson, M., Al-Qattan, K.K., Peltonen-Shalaby, R., Ali, M., (2006): Anti-diabetic and hypolipidaemic properties of ginger (*Zingiber officinale*) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Nutr.* 96(4), 660-666.

Alemanno, L., Ramos, T., Gargadenec, A., Andary, C., Ferriere, N., (2003): Localization and Identification of Phenolic Compounds in *Theobroma cacao* L. Somatic Embryogenesis. *Ann. Bot.* 92, 613-623.

Anasori, P., Asghari, G., (2008): Effects of light and differentiation on gingerol and zingiberene production in callus culture of *Zingiber officinale* Rosc. *Res. Pharm. Sci.* 3(1), 59-63

Andersson, L., (1998): Marantaceae. In: Kubitzki, K. (Ed.): The families and genera of vascular plants. Springer-Verlag, Berlin, 278-293.

Andersson, L., Chase, M.W., (2001): Phylogeny and classification of Marantaceae. Bot. J. Linn. Soc. 135, 275-287.

Aquino, R., Ciavatta, M.L., De Simone, F., Pizza, C., (1990): A flavanone glycoside from *Hamelia patens*. Phytochemistry 29, 2358-2360.

Aquino, R., Morelli, S., Lauro, M.R., Abdo, S., Saija, A., Tomaino, A., (2001): Phenolic constituents and antioxidant activity of an extract of *Anthurium versicolor* leaves. J. Nat. Prod. 64, 1019-1023.

Asolkar, L.V., Kakkar, K.K., Chakre, O.J., (1992): Second supplement to glossary of Indian medicinal plants with active principles, Part I. New Delhi: Publication and Information Directorata, CSIR, 246-248.

Atanassova, M., Bagdassarian, V., (2009): Rutin content in plant products. Journal of U.C.T.M. 44(2), 201-203.

Awaad, A.S., (2006): Phenolic glycosides of *Juncus acutus* and its anti-eczematic activity. Chem. Nat. Comp. 42(2), 152-155.

Bahandari, U., Sharma, J.N., Zafar, R., (1998): The protective action of ethanolic ginger (*Zingiber officinale*) extract in cholesterol fed rabbits. J. Ethnopharmacol. 61(2), 167-171.

Bate-Smith, E.C., (1968): Phenolic constituents of plants and their taxonomic significance II. Monocotyledons. Bot. J. Linn. Soc. 60, 325-356.

Bate-Smith, E.C., (1973): Chemotaxonomy of *Geranium*. Bot. J. Linn. Soc. 67, 347-359.

Berger, A., (2001): Versuche zur Klonierung der Rosmarinsäuresynthase und anderer Gene der Rosmarinsäure-Biosynthese aus *Coleus blumei*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Berger, A., Meinhard, J., Petersen, M., (2006): Rosmarinic acid synthase is a new member of the superfamily of BAHD acyltransferases. *Planta* 224,1503-1510.

Bohm, B.A., (1968): Phenolic compounds in ferns - III: An examination of some ferns for caffeic acid derivatives. *Phytochemistry* 7(10), 1825-1830.

Boldizsár, I., Szucs, Z., Füzfai, Z., Molnár-Perl, I., (2006): Identification and quantification of the constituents of madder root by gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1133(1-2), 259-274.

Brand, S., Hölscher, D., Schierhorn, A., Svatos, A., Schröder, J., Schneider, B., (2006): A type III polyketide synthase from *Wachendorfia thyrsiflora* and its role in diarylheptanoid and phenylphenalenone biosynthesis. *Planta* 224, 413-428.

Bresinsky, A., Körner, C., Kadereit, J.W., Neuhaus, G., Sonnewald, U., (2008): Strasburger - Lehrbuch der Botanik. Spektrum Akademischer Verlag, 36. Auflage.

Caia, Y., Luob, Q., Sunc, M., Corke, H., (2004): Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 74, 2157-2184.

Cañigueral, S., Jose Salvía, M., Vila, R., Iglesias, J., (1996): New Polyphenol Glycosides from *Ramonda myconi*. *J. Nat. Prod.* 59(4), 419-422.

Cantino, P.D., Harley, R.M., Reynolds, T., (1992): Toward a phylogenetic classification of the Labiatae. *Advances in Labiatae Science*, 27-37.

Chase, M.W., (2009): An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot. J. Linn. Soc.* 161, 105-121.

Claeson, P., Tuchinda, P., Reutrakul, N., (1994): Naturally occurring 1,7-diarylheptanoids. *J. Ind. Chem. Soc.* 71, 509-521.

Clifford, M.N., (1999): Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. J. Sci. Food Agric. 79, 362-372.

Clifford, M.N., Ramirez-Martinez, J.R., (1990): Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. Food Chem. 35, 13-21.

Cranfill, R., (2001): Phylogenetic studies in the Polypodiales (Pteridophyta) with an emphasis on the family Blechnaceae. Ph.D. thesis, University of California, Berkeley, California.

Da Silva, V.C., Bolzani, V.S., Young, M.C.M., Lopes, M.N., (2007): A new antifungal phenolic glycoside derivative, iridoids and lignans from *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. (Rubiaceae). J. Braz. Chem. Soc. 18(7), 1405-1409.

D'Auria, J.C., (2006): Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. Plant Biol. 9, 331-340.

De-Eknamkul, W., Ellis, B.E., (1987): Tyrosine aminotransferase: the entrypoint enzyme of the tyrosine-derived pathway in rosmarinic acid biosynthesis. Phytochemistry 26,1941-1946.

Dellagrecia, M., Fiorentino, A., Monaco, P., Previtera, L., Sorrentino, M., (1998): Antialgal phenylpropane glycerides from *Juncus effusus*. Nat. Prod. Lett. 12, 263-270.

Denniff, P., Whiting, D.A., (1976): Biosynthesis of [6]-gingerol, pungent principle of *Zingiber officinale*. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 711-712.

De Tommasi, N., De Simone, F., De Feo, V., Pizza, C., (1991): Phenylpropanoid glycosides and rosmarinic acid from *Momordica balsamina*. Planta Med. 57, 201.

Ducrey, B., Wolfender, J.L., Marston, A., Hostettmann, K., (1995): Analysis of flavonol glycosides of thirteen *Epilobium species* (Onagraceae) by LC-UV and thermospray LC-MS. *Phytochemistry* 38(1), 129-137.

Eberle, D., Ullmann, P., Werck-Reichhart, D., Petersen, M., (2008): cDNA cloning and functional characterisation of CYP98A14 and NADPH:cytochrome P450 reductase from *Coleus blumei* involved in rosmarinic acid biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* 69, 239-253.

El-Demerdash, A., Dawidar, A.M., Keshk, E.M., Abdel-Mogib, M., (2009): Coumarins from *Cynanchum acutum*. *Rev. Latinoamer. Quím.* 37/1.

El-Desouky, S.K., Kim, K.L., Ryu, S.Y., Eweas, A.F., Gamal-Eldeen, A.M., Kim, Y.K., (2007): A new pyrrole alkaloid isolated from *Arum palaestinum* Boiss. and its biological activities. *A. P. S. R.* 30(8), 927-931.

Ellis, B.E., Towers, G.H.N., (1970): Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. *Biochem. J.* 118, 291-297.

El-Sayed, K.A., Halim, A.F., Zaghloul, A.M., Voehler, M., (1994): First report of sarcostin isolation from *Cynanchum acutum* L. (Asclepiadaceae). International Conference on Chemistry and its Role in Development, Faculty of Science, Mansoura University.

Ernst, E., Pittler, M.H., (2004): A randomized controlled trial of ginger to treat nausea and vomiting in pregnancy. *Obstetrics and Gynecology* 103(4), 639-645.

Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C., (2008): Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies* 331(5), 372-379.

Fernandez, L., Martin, T., Villaescusa, L., Bartolome, C., Rubio, B., Diaz, A.M., (1995): Rosmarinic acid and iridoids of *Scrophularia scorodonia* L. *Colloques Institut National de la Recherche Agronomique* 69, 307-308.

Geissman, T.A., Steehink, C., (1957): Flavonoid petal constituents of *Chrysanthemum segetum* L. J. Org. Chem. 22(8), 946-948.

Goel, R.K., Sairam, K., (2002): Anti-ulcer drugs from indigenous sources with emphasis on *Musa sapientum*, *Tamrabhasma*, *Asparagus racemosus* and *Zingiber officinale*. Ind. J. Pharmacol. 34, 100-110.

Graves, A.C.F., Goldman, S.L., (1987): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the monocot genus *Gladiolus*: Detection of expression of T-DNA-encoded genes. J. Bacteriol. 169(4), 1745-1746.

Grayer, R.J., Chase, M.W., Simmonds, M.S.J., (1999): A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: An appreciation of Hegnauer's "Chemotaxonomie der Pflanzen". Biochem. Sys. Ecol. 27(4), 369-393.

Grayer, R.J., Eckert, M.R., Veitch, N.C., Kite, G.C., Marin, P.D., Kokubun, T., Simmonds, M.S., Paton, A.J., (2003): The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, nepetoidins A and B, in the Lamiaceae. Phytochemistry 64(2), 519-528.

Griffiths, L.A., (1958): Phenolic acids and flavonoids of *Theobroma cacao* L. Separation and identification by paper chromatography. Biochem. J. 70(1), 120-125.

Grundmann, O., Butterweck, V., (2007): *Apocynum venetum* L. - von der traditionellen Droge zum modernen Phytopharmakon. Z. Phytother. 28(5), 215-222.

Hänsel, R., Sticher, O., (2006): Ätherische Öle und Drogen, die ätherisches Öl enthalten. Pharmakognosie – Phytopharmazie, Springer, 1023-1140.

Harborne, J.B., (1965): Anthocyanins in ferns. Nature 207, 984.

Harborne, J.B., (1966): Caffeic acid ester distribution in higher plants. Z. Naturforsch. 21b, 604.

Hartley, R.M., Reynolds, T., (1992): Advances in Labiate Science. Royal Botanic Gardens, Kew, 511-522.

Häusler, E., Petersen, M., Alfermann, A.W., (1991): Hydroxyphenylpyruvate reductase from cell suspension cultures of *Coleus blumei* Benth. Z. Naturforsch. 46c, 371-376.

Heneidak, S., Grayer, R.J., Kite, G.C., Simmonds, M.S.J., (2006): Flavonoid glycosides from Egyptian species of the tribe Asclepiadeae (Apocynaceae, subfamily Asclepiadoideae). Biochem. Sys. Ecol. 34, 575-584.

Hernalsteens, J.P., Thia-Toong, L., Schell, J., Van Montagu, M., (1984): An *Agrobacterium*-transformed cell culture from the monocot *Asparagus officinalis*. EMBO J. 3(13), 3039-3041.

Hiller, K., (1965): Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe einiger Saniculoidae. 1. Mitteilung: *Sanicula europaea* L. - Isolierung und quantitative Erfassung von Chlorogen- und Rosmarinsäure. Pharmazie 20(9), 574-579.

Ho, L.K., Chang, C.R., Chang, Y.S., (1995): Chemical components from *Triumfetta bartramia*, J. Chin. Chem. Soc. 42, 93-95.

Hoffmann, L., Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P., Legrand, M., (2003): Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. J. Biol. Chem. 278, 95-103.

Holzmannova, V., (1995): Kyselina rosmarinová její biologická aktivita. Chem. Listy 90, 486-496.

Huang, H.L., Li, D.L., Xu, B., Wang, B.G., (2007): Antioxidative principles of *Jussiaea repens*: an edible medicinal plant. Int. J. Food Sci. Technol. 42, 1219-1227.

Ishimaru, K., Arakawa, H., Neera, S., (1993): Polyphenol production in cell cultures of *Cornus kousa*. *Phytochemistry* 32(5), 1193-1197.

Joe, B., Vijaykumar, M., Lokesh, B.R., (2004): Biological properties of curcumin - cellular and molecular mechanisms of action. *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* 44, 97-111.

Karwatzki, B., Petersen, M., Alfermann A.W., (1989): Transient activity of enzymes involved in the biosynthesis of rosmarinic acid in cell suspension cultures of *Coleus blumei*. *Planta Med.* 55, 663-664.

Kelley, C.J., Mahajan, J.R., Brooks, L.C., Neubert, L.A., Breneman, W.R., Carmack, M., (1975): Polyphenolic acids of *Lithospermum ruderale* Dougl. ex Lehm. (Boraginaceae) 1. Isolation and structure determination of lithospermic acid. *J. Org. Chem.* 40, 1804-1815.

Kempin, B., (1994): Untersuchungen zur Rosmarinsäuresynthese in Suspensionskulturen von *Coleus blumei*: Tyrosin Aminotransferase. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Kim, K.H., Janiak, V., Petersen, M., (2004): Purification, cloning and functional expression of hydroxyphenylpyruvate reductase involved in rosmarinic acid biosynthesis in cell cultures of *Coleus blumei*. *Plant Mol. Biol.* 54, 311-323.

Kojima, M., Villegas, R.J.A., (1984): Detection of the enzyme in Sweet Potato root which catalyzes trans-esterification between 1-O-*p*-coumaroyl-D-glucose and D-quinic acid. *Agric. Biol. Chem.* 48, 2397-2399.

Kono, Y., Kobayashi, K., Tagawa, S., Adachi, K., Ueda, A., Sawa, Y., Shibata, H., (1997): Antioxidant activity of polyphenolics in diets: Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochim. Biophys. Acta* 1335(3), 335-342.

Kowalczyk, A., (1996): HPLC analysis of polyphenolic compounds in *Knautia arvensis* Coult. Beitr. Züchtungsforsch. 2, 389-392.

Kress, W.J., (1990): The phylogeny and classification of the Zingiberales. Ann. Mo. Bot. Gard. 77, 698-721.

Kress, W.J., (1995): Phylogeny of the Zingiberanae: Morphology and molecules. In: Rudall, P., Cribb, P.J., Cutler, D.F., Humphries, C.J., eds.: Monocotyledons. Systematics and Evolution, 443-460.

Kress, W.J., Prince, L.M., Hahn, W.J., Zimmer, E.A., (2001): Unraveling the evolutionary radiation of the families of the Zingiberales using morphological and molecular evidence. Syst. Biol. 50, 926-944.

Krishnan, S., Nair, A., Ramachandran, G., (1999): Revised structures of the flavonoids from *Limnophila gratissima* (Scrophulariaceae). Ind. J. Chem. 38B, 1009.

Kuhnt, M., Rimpler, H., Heinrich, M., (1994): Lignans and other compounds from the mixe Indian medicinal plant *Hyptis verticillata*. Phytochemistry 36(2), 485-489.

Kumaran, A., Karunakaran, R.J., (2007): Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. Food Chem. 100(1), 356-361.

Kwon, H.C., Jung, C.M., Shin, C.G., Lee, J.K., Choi, S.U., Kim, S.Y., Lee, K.R., (2000): A new caffeoyl quinic acid from *Aster scaber* and its inhibitory activity against human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) integrase. Chem. Pharm. Bull. 48(11), 1796-1798.

Lai, H.Y., Lim, Y.Y., Tan, S.P., (2009): Antioxidative, tyrosinase inhibiting and antibacterial activities of leaf extracts from medicinal ferns. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73(6), 1362-1366.

Lamaison, J.L., Petitjean-Freytet, C., Carnat, A., (1990): Rosmarinic acid, total hydroxycinnamic derivatives and antioxidant activity of Apiaceae, Boraginaceae and Lamiaceae medicinals. *Ann. Pharm. Fr.* 48(2), 103-108.

Lasure, A., Van Poel, B., Pieters, L., Claeys, M., Gupta, M., Berghe, D.V., Vlietinck, A.J., (1994): Complement-inhibiting properties of *Apeiba tibourbou*. *Planta Med.* 60, 276-277.

Lee, S.H., Cekanova, M., Baek, S.K., (2008): Multiple mechanisms are involved in 6-gingerol-induced cell growth arrest and apoptosis in human colorectal cancer cells. *Mol. Carcinog.* 47(3), 197-208.

Lee, K.H., Yang, M.C., Kim, K.H., Kwon, H.C., Choi, S.U., Lee, K.R., (2008): A new phenolic amide from the roots of *Paris verticillata*. *Molecules* 13, 41-45.

Lee, S., Blackhall, N.W., Power, Cocking, E.C., Tepfer, D., Davey, M.R., (2001): Genetic and morphological transformation of rice with the *rolA* gene from the Ri TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Sci.* 161(5), 917-925.

Li, S.Y., Chang, C.Q., (2005): Biological effects of chlorogenic acid and body health. *Wei Sheng Yan Jiu.* 34(6), 762-764.

Litvinenko, V.I., Popova, T.P., Simonjan, A.V., Zoz, I.G., Sokolov, V.S., (1975): Gerbstoffe und Oxyzimtsäureabkömmlinge in Labiaten. *Planta Med.* 27, 372-380.

Liu, J., Feng, Z., Xu, J., Wang, Y., Zhang, P., (2007): Rare biscoumarins and a chlorogenic acid derivative from *Erycibe obtusifolia*. *Phytochemistry* 68(13), 1775-1780.

Ly, T.N., Shimoyamada, M., Yamauchi, R., (2006): Isolation and characterization of rosmarinic acid oligomers in *Celastrus hindsii* Benth. leaves and their antioxidative activity. *J. Agric. Food Chem.* 54(11), 3786-3793.

Mahadtanapuk, S., Topoonyanont, N., Handa, T., Sanguansermisri, M., Anuntalabhochai, S., (2006): Genetic transformation of *Curcuma alismatifolia* Gagnep using retarded shoots. Plant Biotechnol. 23, 233-237.

Markham, K.R., (1982): Techniques of Flavonoids Identification. Academic Press, 36-49 and 7-93.

Martz, F., Turunen, M., Julkunen-Tiitto, R., Lakkala, K., Sutinen, M.L., (2009): Effect of the temperature and the exclusion of UVB radiation on the phenolics and iridoids in *Menyanthes trifoliata* L. leaves in the subarctic. Environmental Pollution 157, 3471-3478.

Mascolo, N., Jain, R., Jain, S.C., Capasso, F., (1989): Ethnopharmacological investigation of ginger (*Zingiber officinale*), J. Ethnopharmacol. 27, 129-140.

Miquel, J., Bernd, A., Sempere, J.M., Diaz-Alperi, J., Ramirez, A., (2002): The *Curcuma* antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. Arch. Gerontol. Geriat. 34, 37-46.

Mizukami, H., Ellis, B.E., (1991): Rosmarinic acid formation and differential expression of tyrosine aminotransferase isoforms in *Anchusa officinalis* cell suspension cultures. Plant Cell Rep. 10, 321-324.

Molgaard, P., Ravn, H., (1988): Evolutionary aspects of caffeoyl ester distribution in Dicotyledons. Phytochemistry 27(8), 2411-2421.

Martino, V.S., Debenedetti, S.L., Coussio, J.D., (1979): Caffeoylquinic acids from *Pterocaulon virgatum* and *Pluchea sagittalis*. Phytochemistry 18, 2052.

Mel'chakova, T.N., Kharitonova, N.P., (1976): Amounts of rutin and hyperoside in *Menyanthes trifoliata*. Chem. Nat. Comp. 12(1), 97.

Morishita, H., Iwahashi, H., Kido, R., (1986): 4-O-feruloylquinic acid from green coffee beans. Phytochemistry 25(6), 1496-1497.

Muir, S.R., Collins, G.J., Robinson, S., Hughes, S., Bovy, A., De Vos, R.C.H., van Tunen, A.J., Verhoeyen, M.E., (2001): Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. *Nature Biotechnol.* 19, 470-474.

Mustafa, T., Srivastava, K.C., Jensen, K.B., (1993): Drug development report. 9. Pharmacology of ginger, *Zingiber officinale*, *J. Drug Dev.* 6, 25-39.

Nandakumar, R., Chen, L., Rogers, S.M.D., (2005): *Agrobacterium*-mediated transformation of the wetland monocot *Typha latifolia* L. (Broadleaf cattail). *Plant Cell Rep.* 23, 744-750.

Nayak, S., (2000): In vitro multiplication and microrhizome induction in *Curcuma aromatica* Salisb. *Plant Growth Regulation* 32, 41-47.

Niggeweg, R., Michael, A.J., Martin, C., (2004): Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnol.* 22, 746-754.

Olmstead, R.G., Bohs, L., Abdel-Migid, H., Santiago-Valentin, E., Garcia, V.F., Collier, S.M., (2008): A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon* 57(4), 1159-1181.

Olmstead, R.G., de Pamphilis, C.W., Wolf, A.D., Young, N.D., Elisons, W.J., Reeves, P.A., (2001): Disintegration of the Scrophulariaceae. *Am. J. Bot.* 88, 348-361.

Olthof, M.R., Hollman, P.C., Buijsman, M.N., van Amelsvoort, J.M., Katan, M.B., (2003): Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans, *J. Nutr.* 133, 1806-1814.

Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C., (2004): Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the analysis of antioxidative phenolic compounds in fennel using a narrow bore reversed phase C₁₈ column. *Anal. Chim. Acta* 512(2), 271-280.

Paris, M., (1967): Contribution à l'étude biochimique de la Salicaire (*Lythrum salicaria* L., Lythracées) et en particulier de ses polyphenols. Trav. Lab. Matière Med. Pharm. Galénique Fac. Pharm. Paris 52 I(1), 111.

Parnham, M.J., Kesselring, K., (1985): Rosmarinic acid. *Drugs of the Future* 10, 756-757.

Pasi, S., Aligiannis, N., Chinou, I.B., Skaltsounis, A.L., (2002): Chemical constituents and their antimicrobial activity from the roots of *Cephalaria ambrosioides*. *Natural Products in the new Millennium: Prospects and Industrial Application*, 229-234.

Pedersen, J.A., (2000): Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy. *Biochem. Syst. Ecol.* 28(3), 229-253.

Petersen, M., (1991): Characterization of rosmarinic acid synthase from cell cultures of *Coleus blumei*. *Phytochemistry* 30, 2877-2881.

Petersen, M., (1994): *Coleus* spp. In vitro culture and the production of forskolin and rosmarinic acid. In: Bajaj, Y.P.S.: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants VI*. Springer-Verlag, 69-92.

Petersen, M., (1997): Cytochrome P450-dependent hydroxylation in the biosynthesis of rosmarinic acid in *Coleus*. *Phytochemistry* 45, 1165-1172.

Petersen, M., Alfermann, A.W., (1988): Two new enzymes of rosmarinic acid biosynthesis from cell cultures of *Coleus blumei*: hydroxyphenylpyruvate reductase and rosmarinic acid synthase. *Z. Naturforsch.* 43c, 501-504.

Petersen, M., Simmonds, M.S.J., (2003): Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62, 121-125.

Petersen, M., Häusler, E., Karwatzki, B., Meinhard, J., (1993): Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Benth. *Planta* 189, 10-14.

Petersen, M., Abdullah, Y., Benner, J., Eberle, D., Gehlen, K., Hücherig, S., Janiak, V., Kim, K.H., Sander, M., Weitzel, C., Wolters, S., (2009): Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* 70 (15-16), 1663-1679.

Popescu, M.L., Dinu, M., Ristache, M.Z., Dragoescu, L.D., (2004): Contributions to pharmacological and phytobiological studies of *Pelargonium zonale* folium. *Farmica* (Bucharest, Romania) 52(2), 66-73.

Prediger, R.D.S., Fernandes, A.S., Rial, D., Wopereis, S., Pereira, V.S., Bosse, T.S., Da Silva, C.B., Carradore, R.S., Machado, M.S., Cechinel-Filho, V., Costa-Campos, L., (2008): Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. *J. Ethnopharmacol.* 120(3), 465-473.

Prince, L.M., Kress, W.J., (2006): Phylogenetic relationships and classification in Marantaceae: insights from plastid DNA sequence data. *Taxon* 55, 281-296.

Rainer, D.M., Boulton, M.I., Davies, J.W., Nester, E.W., (1993): VirA, the plant-signal receptor, is responsible for the Ti plasmid-specific transfer of DNA to maize by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3549-3553.

Ramirez-Ahumada, M.C., Timmermann, B.N., Gang, D.R., (2006): Biosynthesis of curcuminoids and gingerols in tumeric (*Curcuma longa*) and ginger (*Zingiber officinale*): Identification of curcuminoid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA thioesterases. *Phytochemistry* 67, 2017-2029.

Rampart, M., Beetens, J.R., Bult, H., Herman, A.G., Parnham, M.J., Winkelmann, J., (1986): Complement-dependent stimulation of prostacyclin biosynthesis: inhibition by rosmarinic acid. *Biochem. Pharmacol.* 15, 35(8), 1397-1400.

Ravn, H., Pedersen, M.F., Andarym, J., Borumm, C., Anthoni, U., Christophersen, C., Nielsen, P.H., (1994): Seasonal variation and distribution of two phenolic compounds, rosmarinic acid and caffeic acid, in leaves and roots-rhizomes of eelgrass (*Zostera marina* L.). *Ophelia* 40, 51-61.

Rhode, J., Fogoros, S., Wahl, H., Griffith, K.A., Huang, J., Liu, J.R., (2007): Ginger inhibits cell growth and modulates angiogenic factors in ovarian cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 7(44).

Ritzmann, P., (2000): Pharma-Kritik. *Venenmittel* 22(7).

Romani, A., Pinelli, P., Mulinacci, N., Vincieri, F.F., Gravano, E., Tattini, M., (2000): HPLC analysis of flavonoids and secoiridoids in leaves of *Ligustrum vulgare* L. (Oleaceae). *J. Agric. Food Chem.* 48(9), 4091-4096.

Rubio, B., Diaz, A.M., Martin, T., Zaragoza, F., Villaescusa, L., (1992): Phenolic compounds in *Scolymus hispanicus* L. *Ars Pharm.* 33, 462-465.

Ryan, L., Heckler, C., Dakhil, S.R., Kirshner, J., Flynn, P.J., Hickok, J.T., Morrow, G.R., (2009): Ginger for chemotherapy-related nausea in cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 27, 15.

Sakui, N., Kuroyanagi, M., Ishitobi, Y., Sato, M., Ueno, A., (1992): Biotransformation of sesquiterpenes by cultured cells of *Curcuma zedoaria*. *Phytochemistry* 31(1), 143-147.

Sakushima, A., Nishibe, S., (1988): Taxifolin 3-arabinoside from *Trachelospermum jasminoides* var. *pubescens*. *Phytochemistry* 27(3), 948-950.

Salvi, N.D., George, L., Eapen, S., (2001): Plant regeneration from leaf base callus of tumeric and random amplified polymorphic DNA analysis of regenerated plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 66, 113-119.

Satake, T., Kamiya, K., Saiki, Y., Hama, T., Fujimoto, Y., Kitanaka, S., Kimura, Y., Uzawa, J., Endang, H., Umar, M., (1999): Studies on the constituents of fruits of *Helicteres isora* L. Chem. Pharm. Bull. 47, 1444-1447.

Satyanarayana, D., Mythirayee, C., Krishnamurthy, V., (1978): Polyphenols of *Andrographis paniculata* Nees. Leather Sci. 25, 250-251.

Scarpati, M.L., Oriente, G., (1958): Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (del *Rosmarinus off.*). Ric. Sci. 28, 2329-2333.

Segawa, A., Miyaichi, Y., Tomimori, T., Kiuch, F., Ohta, T., (1999): Studies on Nepalese crude drugs. XXV. Phenolic constituents of the leaves of *Didymocarpus leucocalyx* C. B. Clarke (Gesneriaceae). Chem. Pharm. Bull. 47, 1404-1411.

Schenk, R.U., Hildebrandt, A.C., (1972): Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50, 199-204.

Schoch, G., Goepfert, S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P., Werck-Reichhart, D., (2001): CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. J. Biol. Chem. 276, 36566-36574.

Shimomura, H., Sashida, Y., Mimaki, Y., (1987): Phenolic glycerides from *Lilium auratum*. Phytochemistry 26, 844-845.

Shirgurkar, M.V., John, C.K., Nadgauda, R.S., (2001): Factors effecting in vitro microrhizome production in tumeric. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 64, 5-11.

Smith, A.R., Pryer, K.M., Schuettpelz, E., Korall, P., Schneider, H., Wolf, P.G., (2006): A classification for extant ferns. Taxon 55(3), 705-731.

Sterbova, D., Matejicek, D., Vlcek, J., Kuba, V., (2004): Combined microwave-assisted isolation and solid-phase purification procedures prior to the

chromatographic determination of phenolic compounds in plant materials. *Annal. Chim. Acta.* 513(2), 435-444.

Takeda, K., Kubota, R., Yagioka, C., (1985): Copigments in the blueing of sepal colour of *Hydrangea macrophylla*. *Phytochemistry* 24(6), 1207-1209.

Takeda, R., Hasegawa, J., Sinozaki, M., (1990): The first isolation of lignans, megacerotonic acid and anthocerotonic acid, from nonvascular plants, Anthocerotae (hornworts). *Tetrahedron Lett.* 31, 4159-4162.

Tanaka, N., Kamiya, T., Shimomura, K., Ishimaru, K., (1998): Micropropagation and polyphenol production in *Cornus* plants. *Jpn. J. Food Chem.* 5(2), 170-177.

Trute, A., Nahrstedt, A., (1996): Separation of rosmarinic acid enantiomers by three different chromatographic methods (HPLC, CE, GC) and the determination of rosmarinic acid in *Hedera helix* L. *Phytochem. Anal.* 7, 204-208.

Trute, A., Nahrstedt, A., (1997): Identification and quantitative analysis of phenolic compounds from the dry extract of *Hedera helix*. *Planta Med.* 63(2), 177-179.

Tsuruga, A., Terasaka, K., Kamiya, K., Satake, T., Mizukami, H., (2006): Elicitor-induced activity of isorinic acid 3'-hydroxylase, an enzyme catalyzing the final step of rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Biotechnol.* 23, 297-301.

Ulbrich, B., Zenk, M.H., (1979): Partial purification and properties of hydroxycinnamoyl-CoA:quinate hydroxycinnamoyl transferase from higher plants. *Phytochemistry* 18, 929-933.

Urzua, A., Modak, B., Villarroel, L., Torres, R., Andrade, L., Mendoza, L., Wilkens, M., (2000): External flavonoids from *Heliotropium megalanthum* and *Huascoense* (Boraginaceae). *Bol. Soc. Chil. Quím.* 45(1), 23-29.

Van Kessel, K.P.M., Kalter, E.S., Verhoef, J., (1986): Rosmarinic acid inhibits external oxidative effects of human polymorphonuclear granulocytes. *Agents and Actions* 17, 3-4.

Veit, M., Weidner, C., Strack, D., Wray, V., Witte, L., Czygan, F.C., (1992): The distribution of caffeic acid conjugates in the Equisetaceae and some ferns. *Phytochemistry* 31(10), 3483-3485.

Velioglu, Y.S., Ekici, L., Poyrazoglu, E.S., (2006): Phenolic Composition of European Cranberry bush (*Viburnum opulus* L.) Berries and Astringency Removal of Its Commercial Juice. *Int. J. Food Sci. Technol.* 41, 1011-1015.

Wang, M.S., Gaugaz, M., (1980): Studies on the chemical constituents of *Daphne giraldii* Nitsche Part II. *Trad. Herb. Drugs* 11, 49-54.

Wagstaff, S.J., Hickerson, L., Spangler, R., Reeves, P.A., Olmstead, R.G., (1998): Phylogeny in Labiatae s.l., inferred from cpDNA sequences. *Pl. Syst. Evol.* 209, 265-274.

Williams, C.A., Harborne, J.B., (1975): Luteolin and daphnetin derivatives in the Juncaceae and their systematic significance. *Biochem. Syst. Ecol.* 3(3), 181-190.

Williams, C.A., Harborne, J.B., (1977): The leaf flavonoids of the Zingiberales. *Biochem. Syst. Ecol.* 5, 221-229.

Xing, J.B., Li, P., Wen, D.L., (2001): Quality evaluation of *Flos Lonicerae* through a simultaneous determination of seven saponins by HPLC with ELSD. *J. Chromatogr. A* 1070(1-2), 43-48.

Xu, M., Wang, D., Zhang, Y.Z., Yang, C.R., (2006): Chemical Composition of *Gentiana rigescens*: Isolation, Identification and HPLC Analysis. *Acta Bot. Yunnanica* 28, 669-672.

Yun, Y.S., Satake, M., Katsuki, S., Kunugi, A., (2004): Phenylpropanoid derivatives from edible canna, *Canna edulis*. *Phytochemistry* 65, 2167-2171.

Yasuda, K., Tsuda, T., Shimizu, H., Sugaya, A., (1988): Multiplication of *Curcuma* Species by Tissue Culture. *Planta Med.* 54(1), 75-79.

Zaghloul, M.G., (2007): Flavonoids from the flowers of *Canna indica* L. *Mansoura J. Pharm. Sci.* 23, 53-60.

Zarate, R., Yeoman, M.M., (1996): Changes in the amounts of (6)-gingerol and derivatives during a culture cycle of ginger, *Zingiber officinale*. *Plant Sci.* 121, 115-122.

Zemtsova, G.N., Bandyukova, V.A., Dzhumyrko, S.F., (1972): Flavones and phenolic acids of *Scabiosa olgae*. *Chem. Nat. Comp.* 8(5), 662.

Zhou, G.X., Yang, Y.C., Shi, J.G., Hu, W.Y., (2002): Study on biflavonoids from stem bark of *Daphne giraldii*. *Chin. Trad. Herb. Drugs* 33, 1061-1063.

Zhu, K., Cordeiro, M.L., Atienza, J., Robinson, W.E. Jr., Chow, S.A., (1999): Irreversible inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integrase by dicaffeoylquinic acids. *J. Virol.* 73(4), 3309-3316.

Zhu, L., Li, Y., Yang, J., Zuo, L., Zhang, D., (2008): Studies on chemical constituents of *Sarcandra glabra*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 33, 155-157.

7. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	vollentsalztes Wasser
B5	B5-Medium nach Gamborg et al. (1968)
BAP	Benzylaminopurin
CA	Chlorogensäure
CB	CB-Medium nach Petersen und Alfermann (1988)
Con. Alk.	Coniferylalkohol
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DC	Dünnschichtchromatografie
EtOH	Ethanol
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie
IAA, IES	Indol-3-Essigsäure
MeOH	Methanol
MS	Medium nach Murashige und Skoog (1962)
MS-Li	MS-Medium für <i>Linum</i> -Kulturen
NAA	Naphthylessigsäure
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie
RA	Rosmarinsäure
SHB	Medium nach Schenk und Hildebrandt (1972)

Dünnschichtchromatografische Analysen

In den folgenden Abbildungen sind die dünnschichtchromatografischen Analysen der Blattextrakte dargestellt, in denen über HPLC RA, CA oder Rutin identifiziert worden waren. Diese DC-Analysen dienten der Verifizierung des Vorkommens der jeweiligen Naturstoffe. Nur wenn beide Analysen (HPLC und DC) positiv ausfielen, wurde die Substanz als RA, CA oder Rutin angegeben.

Die Extrakte wurden auf Kieselgel 60 F₂₅₄ Platten (0,2 mm Schichtdicke) aufgetragen. Zur Analyse von RA und CA diente als Laufmittel Ethylacetat/Chloroform/Ameisensäure 50:40:10. Danach wurde die Platte mit Naturstoffreagenz A und PEG 400 besprüht. Zur Detektion von Rutin wurde das Laufmittel Ethylacetat/Wasser/Ameisensäure 32,5:10:7,5 benutzt, und die Platten mit Naturstoffreagenz A besprüht.

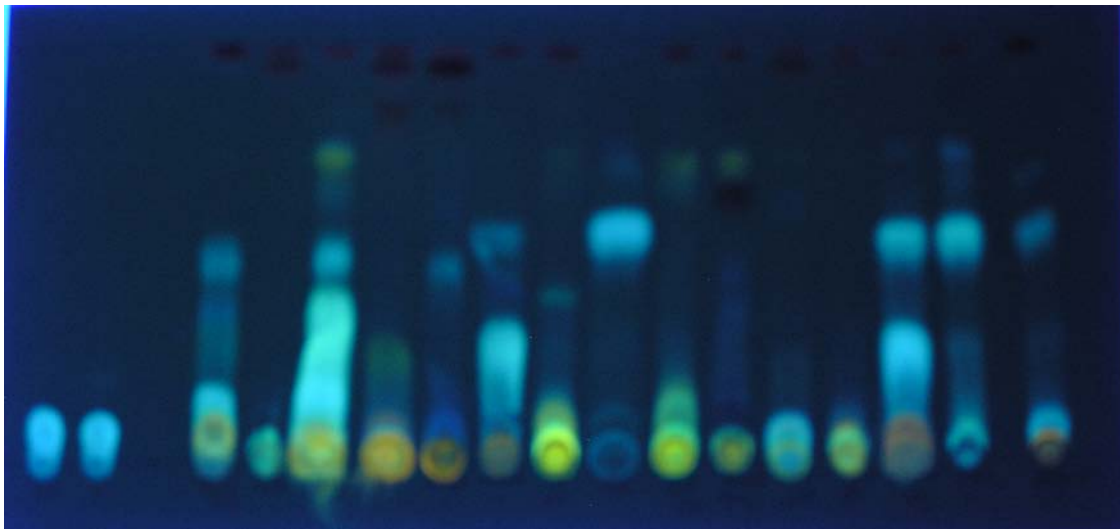


Abb. 1: Extrakte aus: CA – CA – *Theobroma cacao* – *Lantana camara* – *Eryngium bourgatii* – *Abutilon theophrastis* - *Asclepias syriaca* - *Nemophila menziesii* – *Gentiana asclepiadea* - RA - *Gentiana lutea* - *Acanthus longifolius* – *Phlomis tuberosa* - *Verbena officinalis* - *Hydrophyllum virginicum* – *Plectranthus ciliatus* - *Maranta leuconeura*.

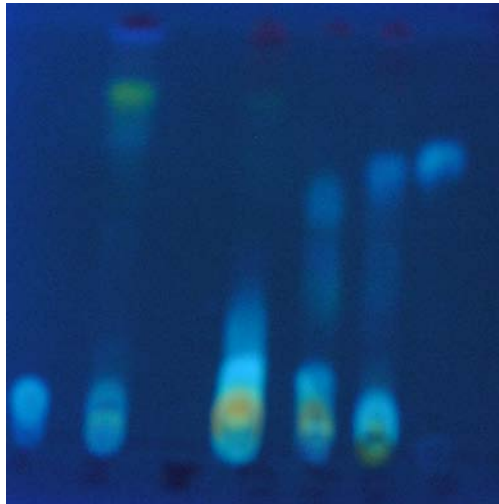


Abb. 2: Extrakte aus: CA - *Knautia dipsacifolia* – *Catharanthus roseus* - *Rubia tinctorum* - *Geranium sylvaticum* - RA.

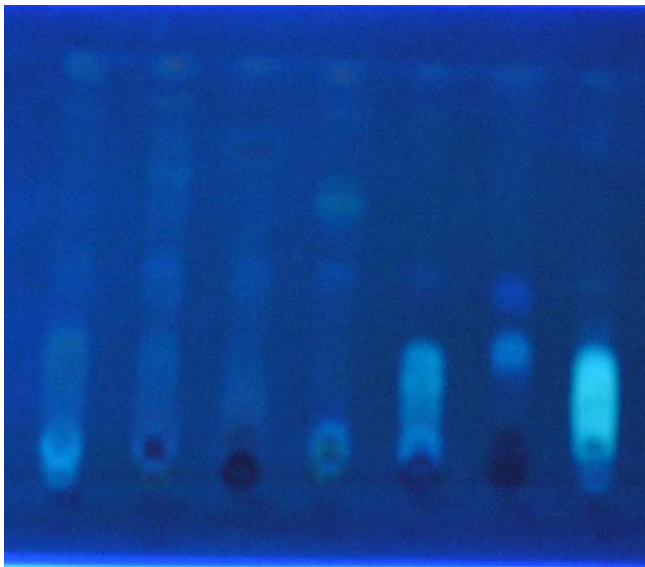


Abb. 3: Extrakte aus: *Centaurea macrocephala* - *Tilia platyphyllos* - *Verbena officinalis* - *Verbena urticifolia* - *Eleutherococcus senticosus* – CA - *Anthriscus sylvestris*.

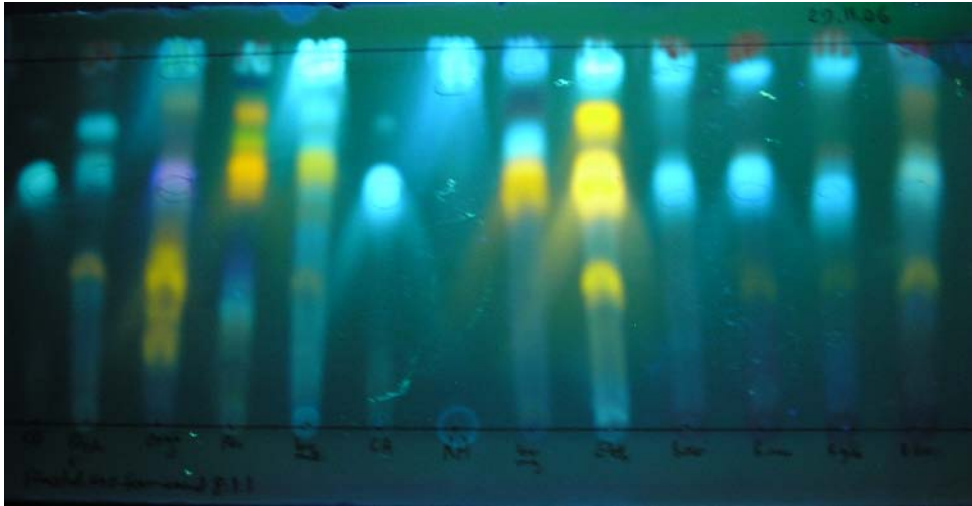


Abb. 4: Extrakte aus: CA - *Blechnum arcuatum* - *Blechnum occidentale* – *Helicteres jamaicensis* – *Salvia officinalis* – CA – RA - *Helicteres jamaicensis* – *Dombeya rotundifolia* - *Blechnum gibbum* - *Blechnum brasiliense* - *Hydrophyllum canadense* - *Blechnum occidentale*.

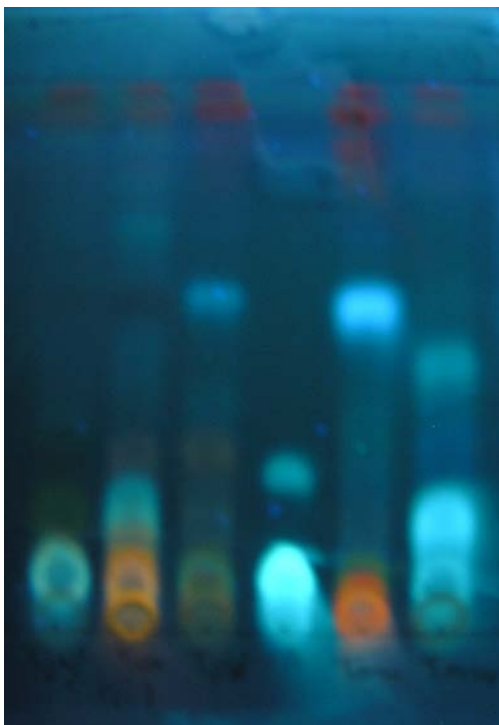


Abb. 5: Extrakte aus: *Tilia japonica* - *Tilia amurensis* - *Tilia americana* – CA - *Tilia tomentosa* - *Tilia cordata*.

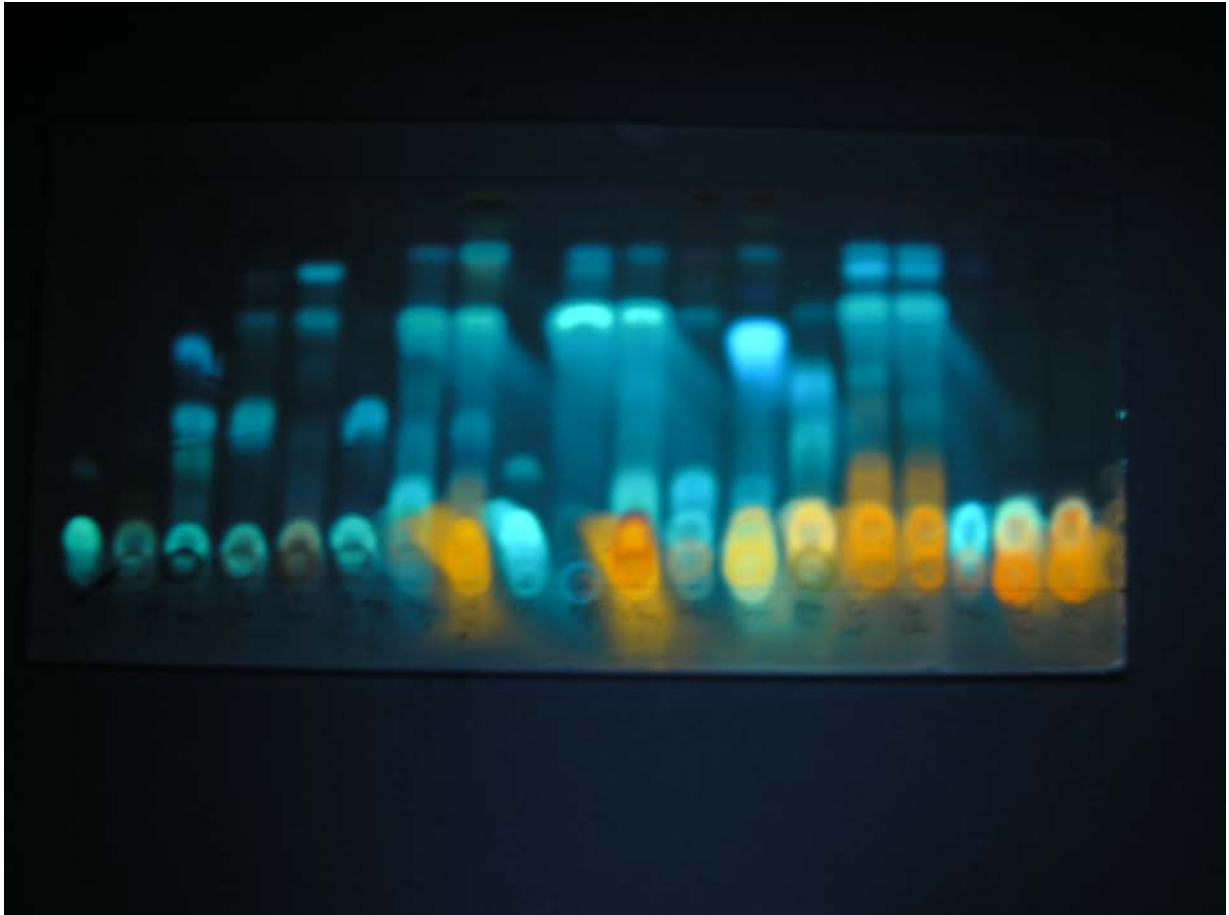


Abb. 6: Extrakte aus: *Jacobinia zelandia* - *Lythrum alatum* - *Juncus effusus* - *Saracha edulis* - *Salvia splendens* - *Linaria triornithophora* - *Collinsonia canadensis* - *Melissa officinalis* - CA - RA - *Hydrophyllum virginicum* - *Dracocephalum spec.* - *Cenolophium denudatum* - *Galium rubioides* - *Micromeria thymifolia* - *Origanum majorana* - *Digitalis lanata* - *Digitalis lutea* - *Plantago schwarzenbergiana*.

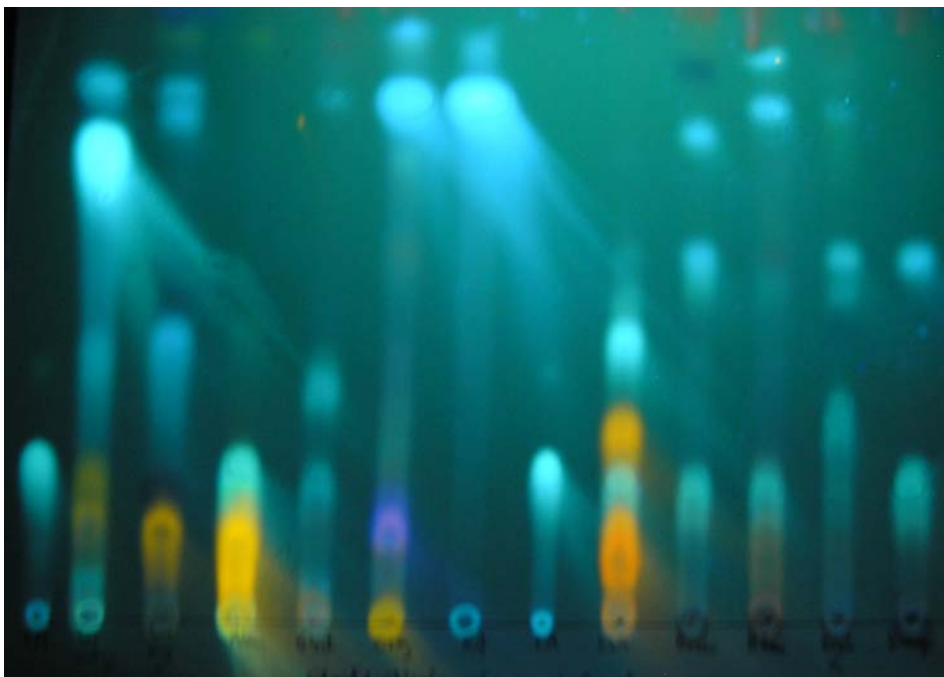


Abb. 7: Extrakte aus: CA - *Verbena spec.* - *Scrophularia nodosa* - *Leonurus cardiaca* - *Seseli hippomarathrum* - *Satureja montana* - RA - CA - *Ilex aquifolium* - *Stromanthe amabilis* - *Glechoma hederacea* - *Dracocephalum spec.* - *Galium boreale*.

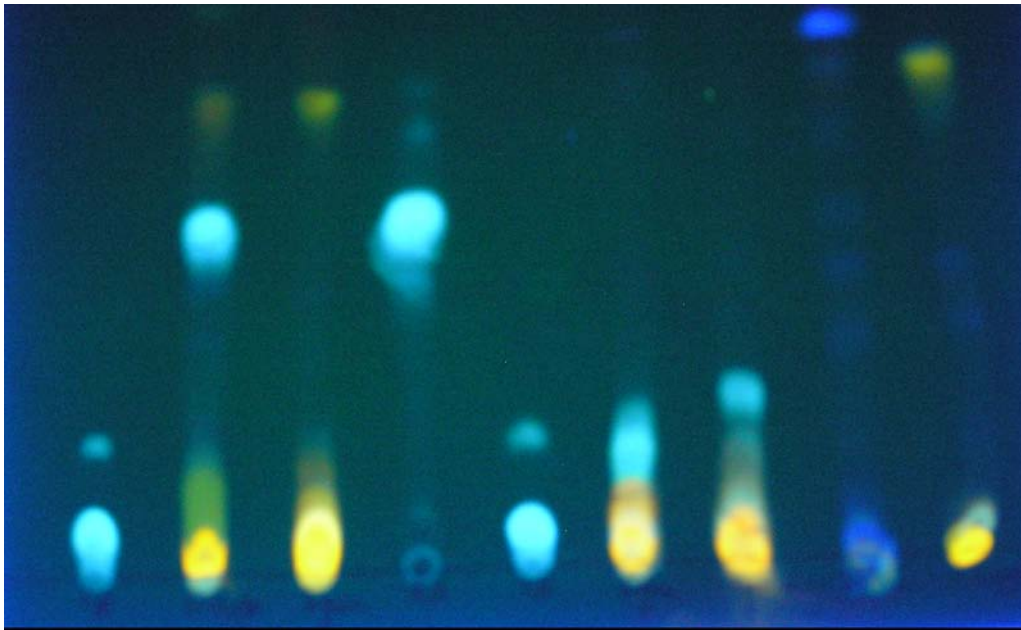


Abb. 8: Extrakte aus: CA - *Satureja montana* – *Ligusticum scoticum* – RA – CA - *Foeniculum vulgare* - *Carum carvi* - *Seseli libanotis* - *Cephalaria gigantea*.

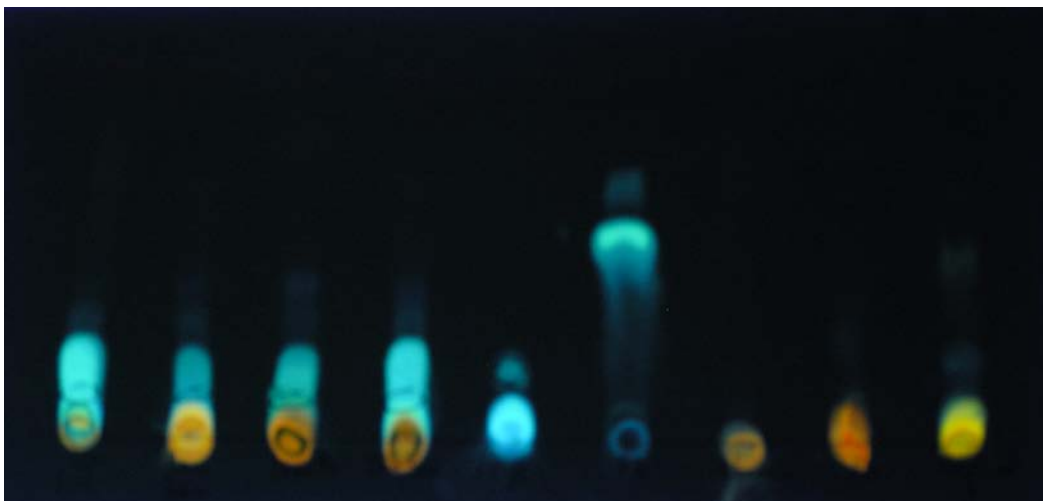


Abb. 9: Extrakte aus: *Lonicera kamtschatica* - *Lonicera emphylocalyx* - *Lonicera demissa* - *Lonicera ferdinandii* – CA – RA - *Lonicera syringantha* – *Asclepias syriaca* – *Erodium manescavii*.

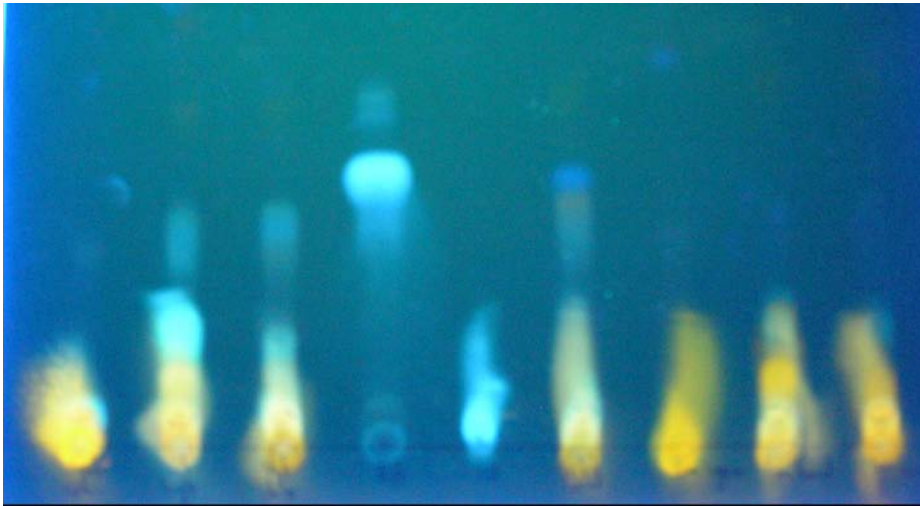


Abb. 10: Extrakte aus: *Aralia californica* - *Viburnum hupehense* - *Viburnum dilatatum* – RA – CA - *Viburnum lantana* - *Geranium sanguineum* - *Geranium swatense* – *Phuopsis stylosa*.

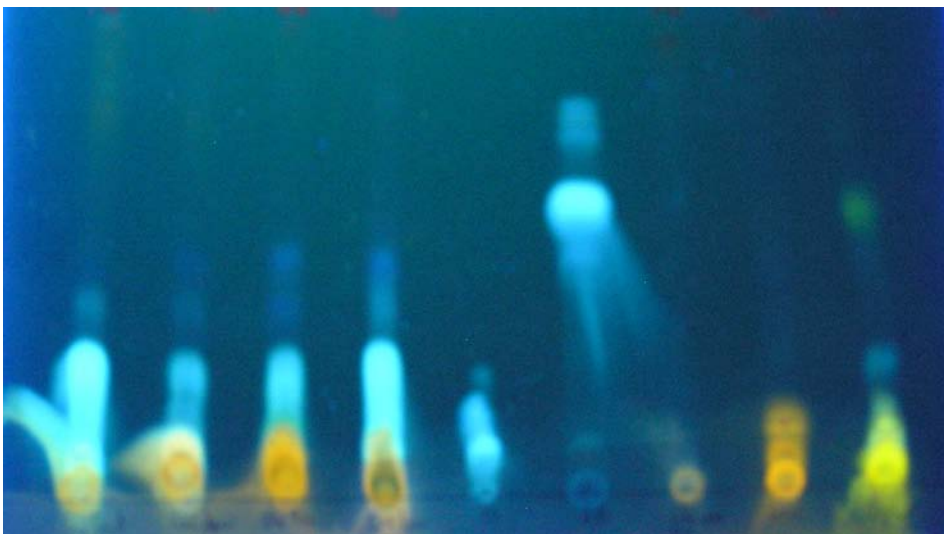


Abb. 11: Extrakte aus: *Lonicera ferdinandii* - *Lonicera demissa* - *Diervilla trifolia* - *Diervilla lonicera* – CA – RA - *Chionodoxa luciliae* – *Cucurbita spec.* – *Cephalaria gigantia*.

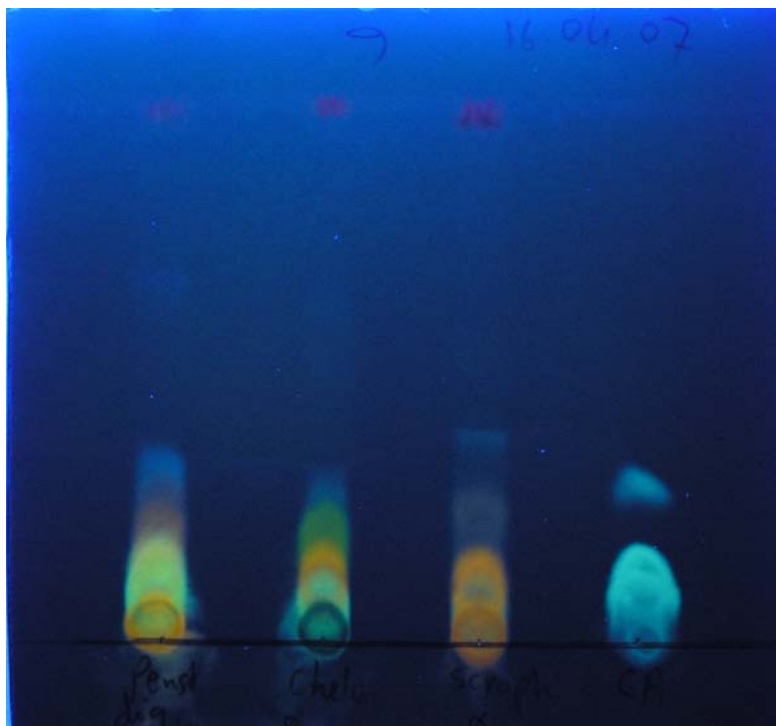


Abb.12: Extrakte aus: *Scabiosa atropurpurea* - *Scabiosa caucasica* - *Dombeya rotundifolia* - CA.

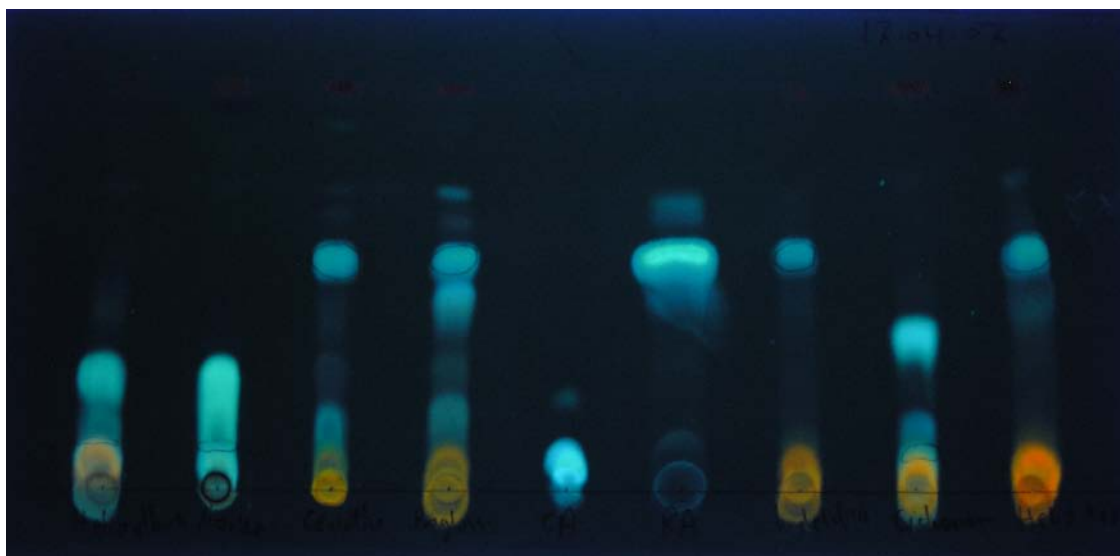


Abb. 13: Extrakte aus: *Helianthus annuus* – *Philadelphus spec.* - *Cerinthe major* – *Buglossoides arvensis* – CA – RA - *Lindelofia longiflora* – *Cichorium intybus* – *Heliotropium amplexicaule*.

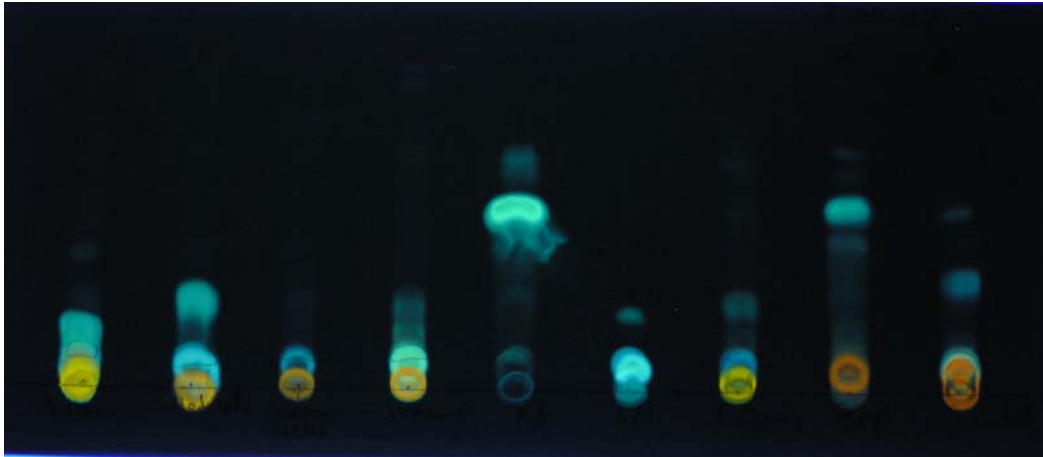


Abb. 14: Extrakte aus: *Succisella inflexa* - *Hedera colchica* - *Hedera helix* – *Juncus effusus* – RA – CA
- *Dipsacus laciniatus* – *Symphytum officinale* – *Echium italicum*.

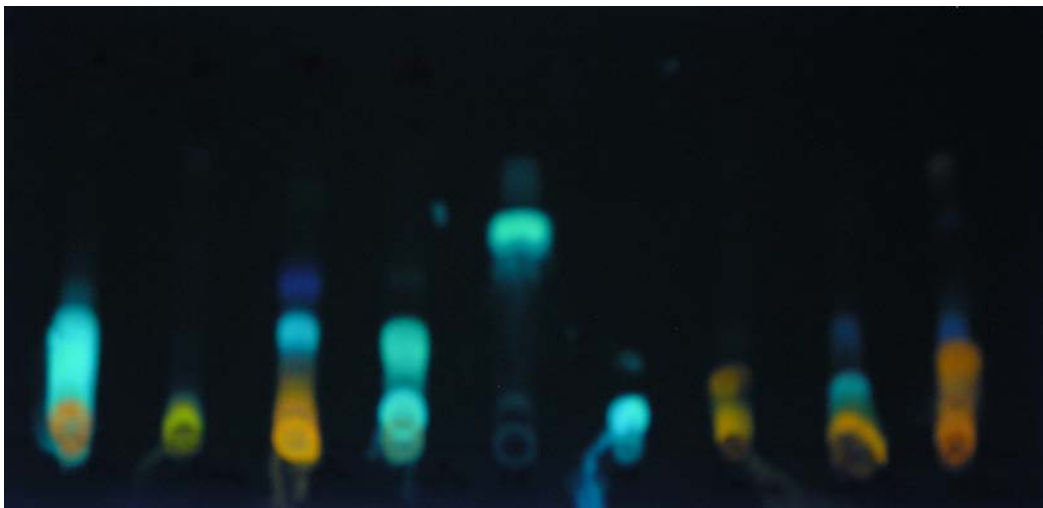


Abb. 15: Extrakte aus: *Arnica chamissonis* - *Abroma augustum* - *Tagetes tenuifolia* - *Achillea millefolia*
- RA - CA - *Gaura biennis* - *Oenothera missouriensis* – *Lopezia racemosa*.

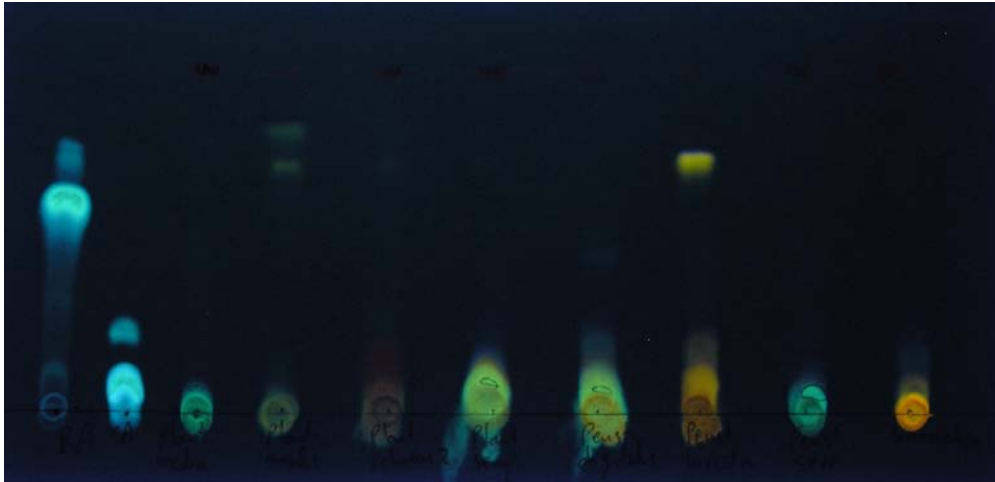


Abb. 16: Extrakte aus: RA – CA - *Plantago nivalis* – *Plantago media* - *Plantago schwarzenbergiana* – *Plantago sempervirens* - *Plantago media*- *Penstemon hirsuta* - *Penstemon serrulatus* - *Penstemon digitalis*.

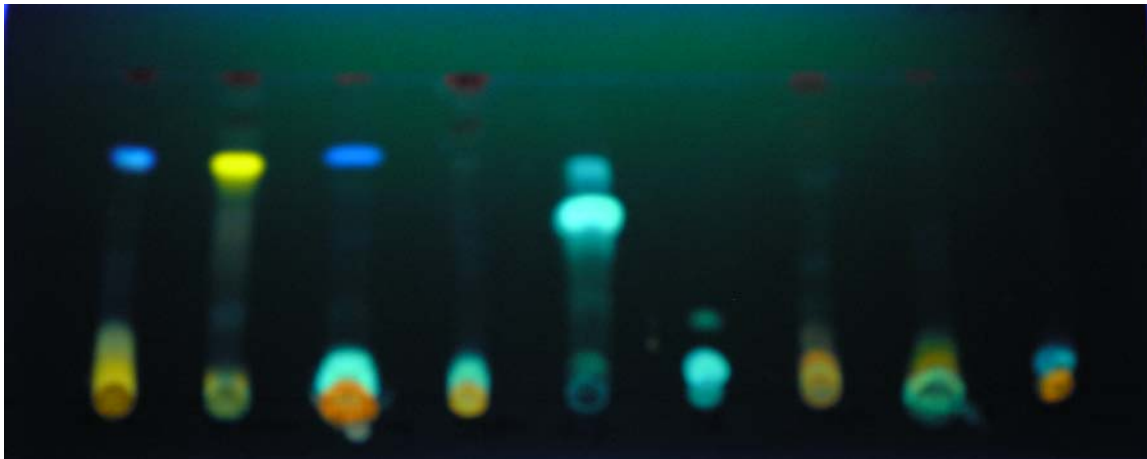


Abb. 17: Extrakte aus: *Veronica longifolia* – *Verbascum undulatum* – *Nicotiana sylvestris* – *Lycopersicon esculentum* – RA – CA - *Scrophularia nodosa* – *Chelone lyonii* – *Withania somnifera*.

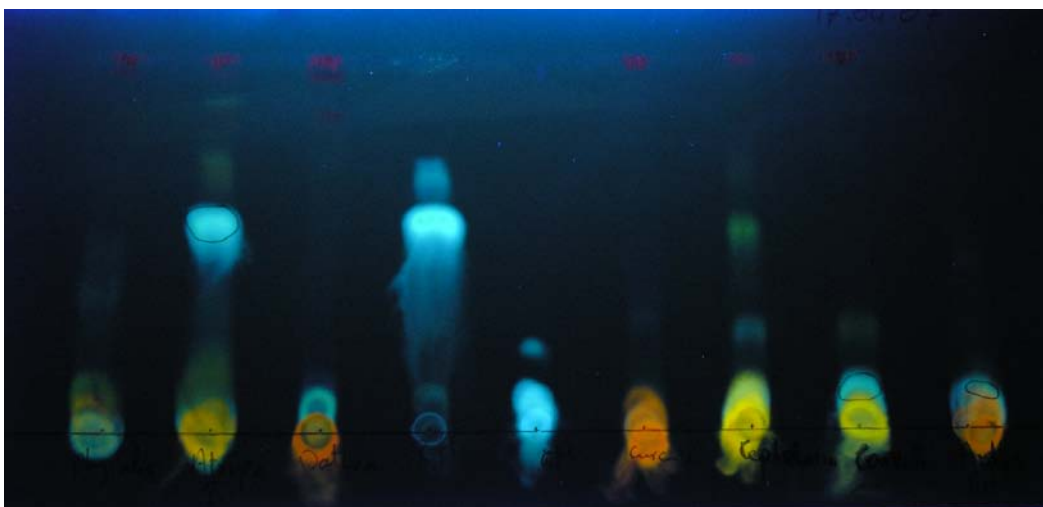


Abb. 18: Extrakte aus: *Physalis alkekengi* - *Salvia splendens* – *Lycopersicon esculentum* – RA – CA - *Cucurbita spec.* – *Cephalaria gigantea* – *Convolvulus tricolor* – *Aralia californica*.

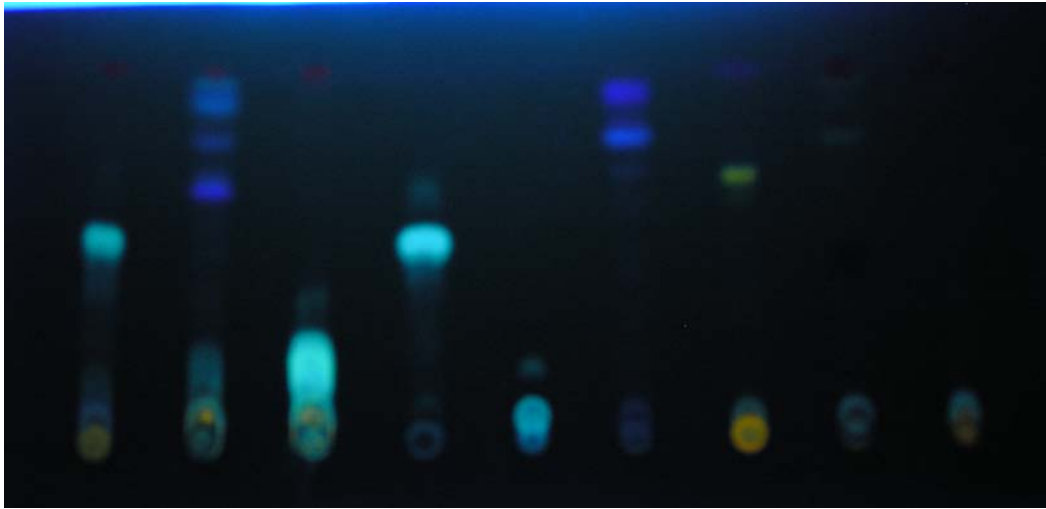


Abb. 19: Extrakte aus: *Anthriscus cerefolium* - *Peucedanum officinale* - *Levisticum officinale* - RA - CA - *Seseli libanotis* - *Seseli hippomarathrum* - *Dorema ammoniacum* - *Apium graveolens*.

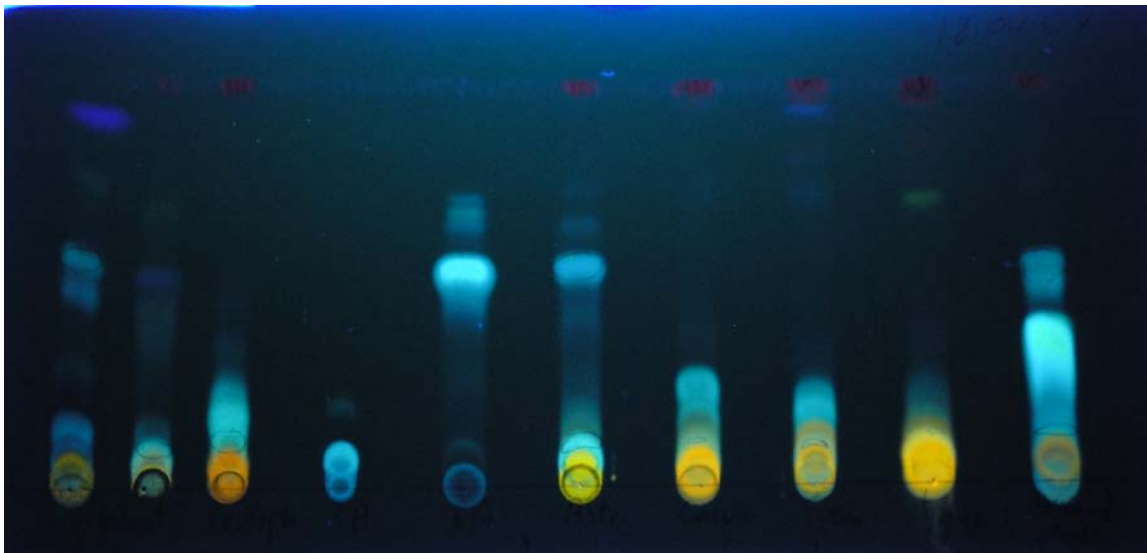


Abb. 20: Extrakte aus: *Lavandula angustifolia* - *Viburnum lantana* - *Atropa belladonna* - CA - RA - *Astringia major* - *Carum carvi* - *Foeniculum vulgare* - *Ligusticum scoticum* - *Lavandula multifida*.

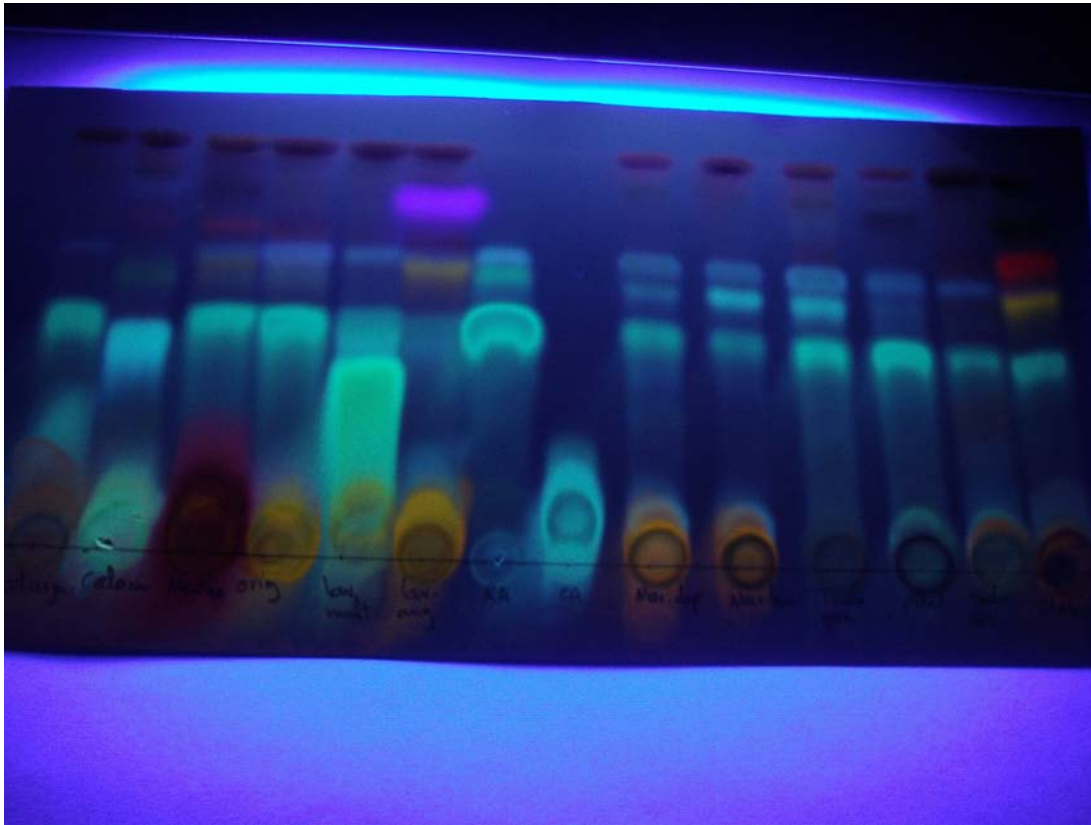


Abb. 21: Extrakte aus: *Cerinthe major* - *Calamintha nepeta* - *Mentha aquatica* - *Origanum majorana* - *Lavandula multifida* - *Lavandula angustifolia* - RA – CA - *Maranta leuconeura* - *Maranta depressa* - *Thalia geniculata* - *Canna indica* - *Canna edulis* - *Salvia officinalis*.



Abb. 22: Extrakte aus: *Stromanthe sanguinea* - Rutin - *Calathea lancifolia* - *Maranta noctiflora* - *Ctenanthe lubbersiana* - *Maranta leuconeura* - *Calathea insignis*.

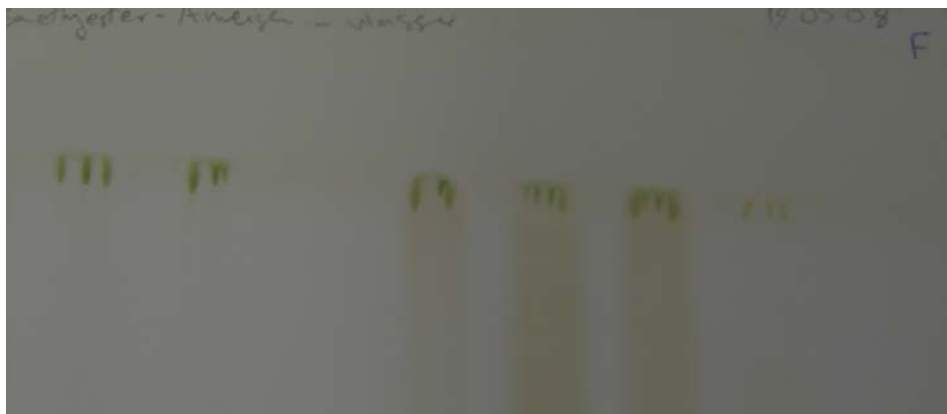


Abb. 23: Extrakte aus: *Ctenanthe burle marxii* - *Calathea media* - Rutin - *Calthea variegata* – *Pleiotachya pruinosa* – *Strelitzia reginae* - *Calathea rotundifolia* - Rutin.



Abb. 24: Extrakte aus: *Ataenidia conferta* - *Calathea warscewiczii* - *Ctenanthe setosa* - *Maranta arundinacea* - Rutin - *Maranta depressa*.



Abb. 25: Extrakte aus: *Ctenanthe kummeriana* - Rutin - *Thalia dealbata* - *Calathea undulata* – *Orchidantha maxillarioides*.

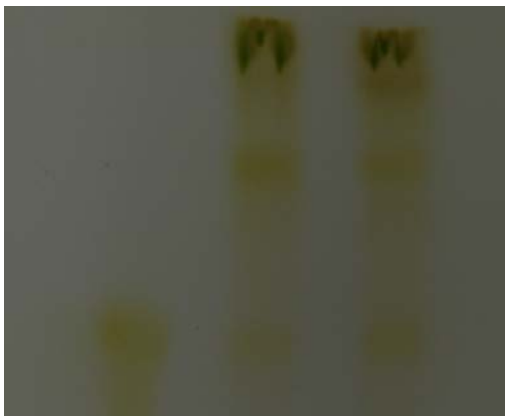


Abb. 26: Extrakte aus: Rutin - *Canna indica* - *Canna edulis*.

Danksagung

Frau Prof. Dr. Maike Petersen danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe an dieser interessanten Themenstellung zu arbeiten sowie für ihre dauerhafte Unterstützung und Diskussionsbereitschaft. Frau PD Dr. Sabine Anagnostou danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Bei Gärtnermeister Walter Rudl vom Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie der Philipps-Universität Marburg sowie allen Mitarbeitern vom Botanischen Garten der Philipps-Universität Marburg möchte ich mich für Bereitstellung des Pflanzenmaterials bedanken. Mein Dank gilt weiterhin Prof. Dr. Dietrich Ober, Botanischer Garten der Christian-Albrechts-Universität und dem Botanischen Garten der Justus-Liebig-Universität Gießen, die uns Pflanzenmaterial für die vorliegenden Untersuchungen zur Verfügung gestellt haben.

Allen Kolleginnen und Kollegen möchte ich herzlich danken für die nette Arbeitsatmosphäre und das gute Nebeneinander im Labor (insbesondere an der HPLC), sowie Fr. Dr. J. Schmitt für ihre zuverlässige Hilfe.

Dr. Bernd Schneider vom Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena danke ich sehr für die NMR-Analyse.

Der Universität Damaskus (Syrien) sowie Herrn Prof. Dr. A. Mardini und Herrn Prof. Dr. I. Agha möchte ich besonders danken für die finanzielle Unterstützung, und stetige Betreuung.

Ganz besonders möchte ich meinem Mann Dr. Kosai Eskef und meinem Sohn Kariem für die immerwährende Unterstützung und Ermutigung sowie die Verschönerung meines Lebens danken.

Meiner Familie insbesondere meinem Vater Dr. Ghassan Abdallah (mein Vorbild im Leben) und seiner Frau Bouthaina Farhat sowie meinem Bruder Dr. Yazan Abdallah und meiner verstorbenen Schwester Zena Abdallah, auch meiner Mutter, bin ich dafür sehr dankbar, dass sie mich stetig unterstützt und an mich geglaubt haben.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Yana Abdullah
Adresse	Lärchenwäldchen 1, 35394 Gießen
Telefon	04917661076740
E-Mail	yana.abdullah@hotmail.de
Geburtsdatum, -ort	20.08.1980 Damaskus (Syrien)
Familienstand	verheiratet, 1 Kind
Staatsangehörigkeit	syrisch, deutsch

Schulbildung

Abschluss (1997)	Allgemeine Hochschulreife (Abitur)
09/1985 - 07/1993	Grund- und Mittelschulausbildung, Saad Ben Muaz, Damaskus
09/1994 - 07/1997	Oberschulausbildung, Althakafie, Damaskus

Hochschulausbildung

20.08.2002	Studium der Pharmazie und Pharmazeutischen Chemie an der Universität Damaskus (Syrien), Abschluss des Studiums (68%)
------------	--

Beruflicher Werdegang

Tätigkeitsbereiche 10/ 2005-08/2010	Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. M. Petersen am Institut für Pharmazeutische Biologie, Philipps-Universität Marburg
11/2008-28/02.2010	Apothekerin

Praktika

05/2001 - 11/2001	Pharmaziepraktikantin in der Apotheke (Damaskus)
11/2001 - 05/2002	Pharmaziepraktikantin bei der Pharmafirma Tamico (Damaskus)

Veröffentlichungen

Occurrence of rosmarinic acid, chlorogenic acid and rutin in Marantaceae species. (Abdullah et al., 2008)
Evolution of rosmarinic acid biosynthesis (Petersen et al., 2009)

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Analyse von phenolischen Naturstoffen“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 12.07.2010

.....
(Yana Abdullah)

Veröffentlichungen

Abdullah, Y., Schneider, B., Petersen, M., (2008): Occurrence of rosmarinic acid, chlorogenic acid and rutin in Marantaceae species. *Phytochemistry* 1(4), 199-203.

Petersen, M., Abdullah, Y., Benner, J., Eberle, D., Gehlen, K., Hücherig, S., Janiak, V., Kim, K.H., Sander, M., Weitzel, C., Wolters, S., (2009): Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* 70 (15-16), 1663-1679.

Vorträge

“Untersuchungen zum Vorkommen von Rosmarinsäure, Chlorogensäure und Rutin in Arten der Familie Marantaceae“. 6. Treffen der Sektion „Pflanzliche Naturstoffe“ in Fulda 2009.